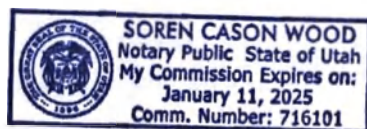


STATE OF UTAH)
 §
COUNTY OF SALT LAKE)

On this 11th day of March 2022, before me, Soren Cason Wood, a notary public, personally appeared Natalie Pupunu, proved on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to this instrument, and acknowledged he executed the same.

Witness my hand and official seal


Soren Cason Wood, Notary Public



Instruction for use of Medical Device BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus)

Legal Manufacturer:

BioFire Diagnostics, LLC
515 Colorow Drive
Salt Lake City, UT 84108, USA
Tel: +1 800 735 65 44
+1 801 736 63 54
Fax: +1 801 588 05 07
e-mail: support@biofiredx.com

Authorized Representative in Russia

LLC "bioMerieux RUSS"
Russia, 115230, Moscow
Nagatinskiy proezd 1, 10, str. 1
Tel./fax: +7 (495) 221 10 79
e-mail: info.russia@biomerieux.com
Website: www.biomerieux-russia.com

Approved by:

Full name: Natalie Pupunu

Position: Associate Director of Regulatory Affairs

Company Name: «БиоФарм Диагностика, ЛЛС» (BioFire Diagnostics, LLC)

Signature: *Natalie Pupunu*

Date: 11 March 2022

Stamp:

Regulatory & Clinical Affairs
BioFire Diagnostics, LLC
515 Colorow Drive
Salt Lake City, Utah 84108
USA



515 Colorow Drive • Salt Lake City, Utah 84108, USA • 801 736 6354 local • 1 800 735 6544 toll-free • 801 588 0507 fax
biofiredx.com

**Инструкция по применению медицинского изделия
«Набор реагентов BioFire Respiratory Panel 2.1 plus
(RP2.1plus)» для обнаружения и идентификации
нуклеиновых кислот возбудителей респираторных инфекций
в образцах носоглоточных мазков методом мультиплексной
ПЦР на системах семейства FilmArray»**

Официальный производитель:

«БиоФаер Диагностикс, ЛЛС» (BioFire Diagnostics, LLC)

515 Colorow Drive

Salt Lake City, UT 84108, USA (США)

Тел.: +1-800 735 65 44

+1-801 736 63 54

Факс: +1-801 588 05 07

Адрес электронной почты: support@biofiredx.com

Уполномоченный представитель в Российской Федерации

ООО «биоМерье Рус»

Россия, 115230, Москва,

1-ый Нагатинский проезд, д. 10, стр. 1

Тел./факс: +7 (495) 221 10 79

Адрес электронной почты: info.russia@biomerieux.com

Веб-сайт: www.biomerieux-russia.com

Утверждено:

Полное имя Натали Пупуни

Должность: Заместитель Директора по вопросам нормативно-правового регулирования

Компания: «БиоФаер Диагностикс, ЛЛС» (BioFire Diagnostics, LLC)

Подпись:

Дата:

Печать:

BioFire® Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus)

IVD

CE 2797



Инструкция по использованию	https://www.biofiredx.com/e-labeling/ITI0019
Краткое руководство пользователя	https://www.biofiredx.com/e-labeling/ITI0064
Паспорт безопасности (ПБ)	https://www.biofiredx.com/e-labeling/ITI0092
Программное обеспечение модуля для кассеты	https://www.biofiredx.com/e-labeling/ITIFA20RP21plus10

Информация о поддержке клиентов и технической поддержке

*Для получения дополнительной информации об обращении в службу поддержки клиентов и технической поддержки см. приложение В.

Телефон: 1-800-735-6544 (бесплатный номер)

Адрес эл. почты: support@BioFireDX.com

Веб-сайт: www.biofiredx.com

Или свяжитесь с местным представительством компании bioMérieux или авторизованным дистрибьютором.

Набор реагентов BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus) для обнаружения и идентификации нуклеиновых кислот возбудителей респираторных инфекций в образцах носоглоточных мазков методом мультиплексной ПЦР на системах семейства FilmArray

ПРЕДУСМОТРЕННОЕ НАЗНАЧЕНИЕ

Назначение

BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus) представляет собой выполняемый по методу амплификации нуклеиновых кислот мультиплексный тест, предназначенный для использования с системами FilmArray производства BioFire (по тексту BioFire FilmArray) для одновременного качественного обнаружения и идентификации нескольких респираторных вирусных и бактериальных нуклеиновых кислот в мазках из носоглотки (МНГ) лиц, подозреваемых в наличии инфекций дыхательных путей, включая COVID-19.

BioFire RP2.1plus позволяет идентифицировать следующие типы и подтипы микроорганизмов.

Вирусы	Бактерии
Adenovirus (Аденовирус)	<i>Bordetella parapertussis</i>
Coronavirus 229E (Коронавирус 229E)	<i>Bordetella pertussis</i>
Coronavirus HKU1 (Коронавирус HKU1)	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Coronavirus NL63 (Коронавирус NL63)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Coronavirus OC43 (Коронавирус OC43)	
Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) (Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV))	
Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2))	
Human Metapneumovirus (Метапневмовирус человека)	
Human Rhinovirus/Enterovirus (Риновирус/энтеровирус человека)	
Influenza A (Грипп А), включая подтипы H1, H3 и H1-2009	
Influenza B (Грипп В)	
Parainfluenza Virus 1 (Вирус парагриппа 1)	
Parainfluenza Virus 2 (Вирус парагриппа 2)	

Вирусы	Бактерии
Parainfluenza Virus 3 (Вирус парагриппа 3)	
Parainfluenza Virus 4 (Вирус парагриппа 4)	
Respiratory Syncytial Virus (Респираторно-синцитиальный вирус)	

Нуклеиновые кислоты от респираторных вирусов и бактерий, идентифицируемые этим тестом, обычно обнаруживаются в образцах МНГ в течение острой фазы инфекции. Обнаружение и идентификация конкретных вирусных и бактериальных нуклеиновых кислот у лиц с признаками и/или симптомами респираторной инфекции указывают на наличие идентифицированного микроорганизма и помогают, если их использовать в сочетании с другой клинической и эпидемиологической информацией, диагностировать респираторные инфекции. Результаты этого теста не следует использовать в качестве единственной основы для диагностики, лечения и принятия других решений касательно пациента.

Отрицательные результаты в контексте респираторного заболевания могут быть обусловлены инфицированием патогенными микроорганизмами, которое не обнаруживает этот тест, или инфекцией нижних дыхательных путей, которая может быть не обнаружена образцами мазков из носоглотки. Положительные результаты не исключают сопутствующую инфекцию, вызванную другими микроорганизмами. Обнаруженный(-ые) BioFire RP2.1*plus* возбудитель(-и) может (могут) не являться точной причиной заболевания. При оценке пациента с возможной инфекцией дыхательных путей может потребоваться дополнительное лабораторное тестирование (например, бактериальные и вирусные культуры, иммунофлюоресценция и рентгенография).

Предполагаемый пользователь и среда использования

Медицинское изделие BioFire RP2.1*plus* должно использоваться обученным медицинскими работниками и лаборантами в лабораторных условиях или под наблюдением обученного лаборанта

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Респираторные патогенные микроорганизмы вызывают острое местное и системное заболевание, причем наиболее тяжелые случаи встречаются у детей, пожилых людей и лиц с ослабленным иммунитетом. Респираторные симптомы могут включать в себя кашель, выделения из носа, заложенность носа, лихорадку, хрипы, одышку, головную боль и боль в мышцах. Из-за сходства вызываемых многими вирусами и бактериями болезней диагностика на основании одних только клинических симптомов затруднительна. Идентификация потенциальных возбудителей дает данные, помогающие врачу определить соответствующее лечение пациента и ответные меры органов здравоохранения для сдерживания распространения заболевания. BioFire RP2.1*plus* является тестом мультиплексной полимеразной цепной реакции со вложенной парой праймеров, предназначенным для одновременной идентификации нуклеиновых кислот от 23 различных вирусов и бактерий, являющихся возбудителями инфекций дыхательных путей, по одному образцу мазка из носоглотки (МНГ).

Краткий обзор обнаруживаемых микроорганизмов

Аденовирусы (AdV) представляют собой разнородную группу ДНК-содержащих вирусов без оболочки семи видов (от А до G).¹ Виды В, С, Е аденовируса вызывают острое респираторное заболевание, однако все типы были связаны с заболеванием человека.² Другие виды аденовирусов (А, D, F и G) могут вызывать различные заболевания, в том числе цистит, гастроэнтерит, конъюнктивит³, и также могут обнаруживаться в респираторных образцах. Вспышки заболеваний часто происходят в таких учреждениях, как центры военной подготовки, стационары длительного пребывания и детские больницы высокоспециализированной медицинской помощи, что обусловлено высокими темпами передачи в закрытых популяциях.⁴⁻⁶ Аденовирусы выделяются в течение длительного периода времени и сохраняются на поверхностях в контагиозном состоянии.⁶

Коронавирусы (CoV): то, что коронавирусы человека являются респираторными патогенными микроорганизмами, было установлено в 60-х годах 20-го века, на настоящий момент описано семь серологических вариантов, связанных с заболеваниями у человека: четыре типа (**коронавирусы 229Е, OC43, HKU1, NL63**), которые постоянно циркулируют в человеческих популяциях, отвечая примерно за 15% случаев простуды^{7,8}, и три штамма (**Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV)**, **Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV)** и **Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2)**), которые перешли с животных на человеческую популяцию с 2002 г.⁸ и представляют собой текущую угрозу для здравоохранения, связанную с развивающимися зоонозными патогенными микроорганизмами. О сдерживании SARS-CoV было объявлено ВОЗ в 2003 г., менее чем через 12 месяцев после его возникновения, и с 2004 г. о новых случаях не сообщалось. MERS-CoV, который был впервые описан в 2012 г.,⁹ продолжает вызывать случайные вспышки, для которых характерна передача от животных к человеку, а затем от человека к человеку.¹⁰ SARS-CoV-2 — новый коронавирус, вызывающий COVID-19, заболевание, которое достигло уровня пандемии за краткое время после его появления в конце 2019 г.^{11,12} Коронавирусы были связаны с крупом и обострением астмы.^{13,14} Инфекции коронавирусом 229Е, OC43, HKU1 и NL63 чаще возникают зимой, и наблюдается периодичность их возникновения.¹⁵ Заболевания, вызванные этими коронавирусами, обычно являются самоограничивающимися.¹⁶ Хотя коронавирусы как группа чаще всего связаны с инфекциями верхних дыхательных путей, все человеческие коронавирусы также связаны с инфекциями нижних дыхательных путей, и MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 могут вызывать синдром острого респираторного дистресса (ARDS), а также со значительной частотой госпитализаций, осложнений и смертельных исходов, особенно у пациентов с сопутствующими заболеваниями.¹⁷ Вариант MERS-CoV является уникальным среди коронавирусов, также вызывая острую почечную недостаточность у более чем половины пациентов.^{18,19} Заражение данным вирусом приводит к летальному исходу у ~25–76,5% людей.¹⁰

Примечание. SARS-CoV не обнаруживается BioFire RP2.1*plus*.

Метапневмовирус человека (hMPV) входит в семейство *Paramyxoviridae*.²⁰ HMPV был обнаружен в 2001 году в качестве респираторного патогенного микроорганизма у детей.²¹ Дальнейшие исследования подтвердили наличие инфекций hMPV у людей всех возрастов.²² Могут одновременно циркулировать два генотипа, А и В, которые, по-видимому, не различаются по тяжести заболевания.²⁰ HMPV является второй основной причиной бронхолита у маленьких детей.²⁰ Кроме того, инфекция может приводить к широкому ряду симптомов заболеваний нижних и верхних дыхательных путей: кашель, ринорея, одышка, затруднение дыхания, жар.²³ Считается, что на долю HMPV приходится 5–7% инфекций дыхательных путей у детей и 3% у людей всех возрастов.²³ Пиковый сезон hMPV приходится на зиму и раннюю весну и часто совпадает с пиковым сезоном респираторно-синцитиального вируса (RSV).²⁴

Вирусы гриппа А и В являются РНК-вирусами семейства *Orthomyxoviridae*. Во время ежегодных эпидемий гриппа у 5–20% населения встречаются инфекции верхних дыхательных путей с быстрым началом лихорадки.²⁵ Доминирующий тип вируса гриппа часто изменяется из-за антигенного дрейфа и сдвига.²⁶ Вирус гриппа А можно субтипировать по генам гемагглютинаина (H) и нейраминидазы (N); подтипы H1N1 и H3N2 вируса гриппа А представляют собой штаммы, которые наиболее часто заражают людей. С подтипом H3N2 связаны более тяжелые заболевания и повышенная смертность.²⁶ Во время сезона гриппа 2009–2010 годов доминирующим циркулирующим вирусом гриппа был грипп А (H1N1)pdm09 (H1-2009, также известный как «свиной грипп»): на него приходилось приблизительно 99% зарегистрированных инфекций гриппа. Он заменил собой штаммы H1N1, существовавшие до 2009 года (Табл. 1).²⁷ В настоящее время имеется, по крайней мере, четыре противовирусных средства для лечения гриппа: амантадин, римантадин, занамивир и осельтамивир, эффективность которых зависит от типа, а с распространением новых штаммов вируса — от устойчивости к лекарственным препаратам.²⁸ Осложнения при вирусной и бактериальной пневмонии увеличивают смертность от вызванных вирусами гриппа инфекций.²⁹

Табл. 1. Доли вызванных подтипами вируса гриппа инфекций в Соединенных Штатах (по данным центров по контролю и профилактике заболеваний США)

Сезон заболевания гриппом ¹	Грипп А	% от подтипов гриппа А			Грипп В
		H1	H1-2009	H3	
2019–2020 ²	58,3%	0,0	92,7	7,3	41,7%
2018–2019	94,3%	0,0	55,5	44,5	5,7%
2017–2018	71,0%	0,0	15,5	84,5	29,0%
2016–2017 ³	77,1%	0,0	3,1	96,9	22,9%
2015–2016 ³	70,3%	0,0	78,4	21,6	29,7%
2014–2015	83,1%	0,0	0,5	99,5	16,9%
2013–2014	85,2%	0,0	87,3	12,7	14,8%
2012–2013	70,4%	0,0	5,2	94,8	29,6%

¹ По данным CDC FluView от 8 мая 2020 г.

² Совокупные результаты за период по 18 апреля 2020 г.

³ Сезон, в течение которого были накоплены описанные в данной документации проспективные клинические данные.

Вирус парагриппа (PIV) является РНК-вирусом семейства *Paramyxoviridae*. В 1950-х годах было установлено, что вирусы парагриппа являются респираторными патогенными микроорганизмами, отличными от вирусов гриппа.³⁰ Вирусы парагриппа делятся на четыре типа (**вирусы парагриппа 1, 2, 3 и 4**). Вирус парагриппа 1 вызывает каждые два года эпидемии осенью; этому вирусу приписываются 50% случаев крупы.³⁰ Вирус парагриппа 2 имеет периодичность эпидемий от одного до двух лет, которые могут чередоваться со вспышками заболеваемости парагриппом 1.³⁰ Дети младше шести месяцев особенно восприимчивы к инфицированию вирусом парагриппа 3, при этом вспышки заболеваемости происходят в отделениях интенсивной терапии новорожденных. Из всех штаммов парагриппа PIV3 имеет самые высокие показатели осложнений и смертности³¹; эпидемии чаще всего случаются в весенне-летний период.³⁰ Вызванная вирусом парагриппа 4 инфекция поражает все возрастные группы, однако из-за редкого обнаружения ее периодичность не установлена.^{32,33}

Респираторно-синцитиальный вирус (RSV) является членом семейства РНК-вирусов *Paramyxoviridae*, связанных с метапневмовирусами и вирусами парагриппа человека.³⁴ RSV делится на два основных подтипа (А и В), распространенность которых ежегодно меняется.³⁵ RSV является наиболее частой причиной тяжелых респираторных заболеваний у детей раннего возраста, при этом основной причиной госпитализации является острый бронхолит.³⁴ Сейчас RSV также считается значимым патогенным микроорганизмом у взрослых, хотя в

целом болезнь у взрослых пациентов проходит с меньшей тяжестью и ограничивается верхними дыхательными путями.³⁶ Пик активности RSV обычно приходится на январь и февраль.³⁷

Риновирусы и энтеровирусы являются родственными РНК-вирусами семейства *Picornaviridae*.³⁸ Согласно серологическому исследованию капсидного белка, существует более 100 серотипов риновируса человека.³⁸ Отмечено, что риновирус вызывает «типичную простуду», но может также участвовать в провоцировании приступов астмы и тяжелых осложнений.³⁸ Энтеровирусы делятся на четыре вида, которые включают в общей сложности не менее 89 различных типов. Отдельные типы могут быть связаны с различными клиническими проявлениями, в том числе неспецифическими респираторными заболеваниями у младенцев и взрослых.³⁹ Риновирусы и энтеровирусы широко распространены независимо от времени года.^{40,41}

Грамотрицательная бактерия *Bordetella pertussis* является преобладающим возбудителем коклюша — предотвращаемой с помощью вакцины болезни, которая подлежит обязательной регистрации в организациях здравоохранения.^{42–44} Коклюш встречается чаще всего у детей, но бывает и у подростков, и у взрослых, а также были зарегистрированы вспышки у полностью вакцинированного населения из-за пониженного иммунитета (было показано, что иммунитет снижается через 5–10 лет после вакцинации).^{44,45} Ранняя (катаральная) стадия заболевания коклюшем неспецифична, и классические признаки коклюша (приступы кашля, коклюшный реприз, рвотные позывы вслед за приступом сильного кашля, а также апноэ и цианоз у детей раннего возраста) возникают только примерно через две недели после первого появления симптомов. Известно, что *Bordetella parapertussis* вызывает более мягкое заболевание, напоминающее коклюш.⁴⁴ Для инфекции *Bordetella* не было установлено какого-либо пикового сезона.

Chlamydia pneumoniae (ранее известная как *Chlamydophila pneumoniae*) — облигатная внутриклеточная бактерия, которая вызывает острые респираторные инфекции и является частой причиной атипичной (легкой) внебольничной пневмонии и бронхита.^{46–48} *C. pneumoniae* имеет инкубационный период около трех недель и может передаваться от бессимптомных носителей.⁴⁸ Вспышки заболеваемости происходят в школах, военных казармах, домах-интернатах для престарелых и инвалидов.⁴⁹ Для инфекций, связанных с *C. pneumoniae*, не было установлено какого-либо пикового сезона.

Mycoplasma pneumoniae — еще один бактериальный возбудитель внебольничной атипичной пневмонии, часто в условиях вспышки заболеваемости.^{50,51} Инкубационный период инфекции *M. pneumoniae* составляет приблизительно 1–4 недели.⁵² Респираторное заболевание *M. pneumoniae* не имеет определенного сезона наивысшей заболеваемости, но эпидемии имеют периодичность 3–7 лет.⁵¹

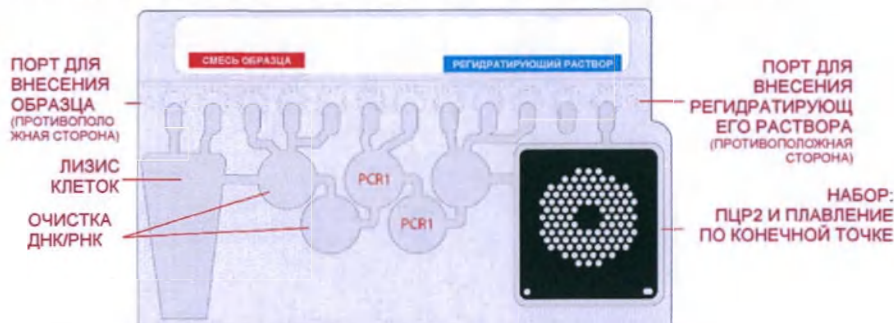
ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Кассета с реагентами BioFire® RP2.1plus представляет собой закрытую одноразовую систему, которая содержит все химические реактивы, необходимые для подготовки образца, обратной транскрипции, полимеразной цепной реакции (ПЦР), обнаружения для изоляции, амплификации и определения нуклеиновых кислот разных возбудителей инфекций дыхательных путей в одном образце. После сбора образца пользователь впрыскивает Hydration Solution (Регидратирующий раствор) и образец с Sample Buffer (Буферный раствор) в кассету с реагентами, помещает кассету с реагентами в модуль прибора семейства FilmArray производства BioFire и запускает тест. Весь процесс теста занимает около 45 минут. Дополнительные подробности можно найти в соответствующем руководстве пользователя системы семейства FilmArray производства BioFire.

Во время теста система семейства FilmArray® выполняет следующие действия.

- Лизис образца путем перемешивания (гомогенизации) в дополнение к химическому лизису, опосредуемому Sample Buffer (Буферный раствор).
- Экстракция и очистка всех нуклеиновых кислот из образца по технологии связывания на магнитных частицах.

- Выполнение мультиплексной ПЦР со вложенной парой праймеров:
 - сначала выполняется обратная транскрипция, а потом первая стадия мультиплексной реакции ПЦР (ПЦР1);
 - затем выполняются множественные одновременные полимеразные цепные реакции второй стадии (ПЦР2) в наборе реагентов для амплификации последовательностей в продуктах ПЦР1.
- Использование данных кривой плавления по конечной точке для определения специфических для мишени ампликонов и анализа данных с целью получения результата для каждого анализата.



ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Каждый набор содержит достаточное количество реагентов для тестирования 30 образцов (набор с 30 кассетами — REF № 423740):

- кассеты с реагентами BioFire RP2.1plus в индивидуальной упаковке;
- одноразовые ампулы с раствором Sample Buffer (Буферный раствор) (1,0 мл);
- одноразовые предварительно заполненные Hydration Injection Vials (Флаконы для внесения растворителя) (1,5 мл) (синие);
- одноразовые Sample Injection Vials (Флаконы для внесения образца) (красные);
- Transfer Pipettes (пипетки) в индивидуальной упаковке

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Системы семейства FilmArray производства BioFire*
- 10%-ный раствор гипохлорита натрия (далее по тексту отбеливатель) или схожего дезинфицирующего средства.

* На территории Российской Федерации пользователь может применять только медицинские изделия, зарегистрированные в установленном порядке (см. Приложение D).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Общие предупреждения

1. Квалифицированные медицинские работники должны внимательно интерпретировать результаты BioFire RP2.1plus в сочетании с оценкой признаков и симптомов пациента, результатами других диагностических тестов, другой эпидемиологической информацией.
2. Кассеты с реагентами BioFire RP2.1plus предназначены для использования только с системами FilmArray 2.0 или FilmArray Torch производства BioFire.
3. Всегда проверяйте срок годности на кассете с реагентами. Не используйте кассету с реагентами после истечения срока годности.
4. Кассеты с реагентами BioFire RP2.1plus хранятся в условиях вакуума в отдельно упакованных контейнерах. Для сохранения герметичности вакуума кассеты для правильной работы убедитесь, что прибор/модуль доступен и находится в рабочем состоянии, прежде чем удалять упаковку с кассеты с реагентами для ее загрузки.

Правила техники безопасности

1. Используйте соответствующие средства индивидуальной защиты (СИЗ), включая (помимо прочего) чистые одноразовые перчатки без талька и лабораторные халаты. Защищайте кожу, глаза и слизистые оболочки. Часто меняйте перчатки при работе с реагентами и образцами.
2. Обращайтесь со всеми образцами и отходами как с потенциально инфекционными материалами. Соблюдайте инструкции по технике безопасности, в том числе указанные в следующих документах:
 - CDC/NIH *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*⁵²
 - CLSI Document M29 *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections*⁵³
 - См. Предварительные рекомендации по технике безопасности в лабораториях при обращении с образцами, связанными с SARS-CoV-2, и их обработке www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab-biosafety-guidelines.html или более актуальные рекомендации, специфические для SARS-CoV-2.
3. При работе с биологическими образцами следуйте процедурам безопасности, принятым в вашем учреждении.
4. При подозрении на инфекцию SARS-CoV-2 или MERS-CoV на основании текущих клинических и эпидемиологических критериев, рекомендованных органами здравоохранения, следует собирать образцы с соответствующими мерами предосторожности в отношении инфекции.
5. Если на основании рекомендованных органами здравоохранения действующих клинических и эпидемиологических критериев скрининга подозревается заражение новым вирусом гриппа А, то следует собрать образцы с соблюдением соответствующих мер инфекционного контроля для новых вирулентных вирусов гриппа и отправить их на тестирование в региональное или местное управление здравоохранения. Пытаться получить культуры вирусов в этих случаях не следует, если нет установки BSL 3+ для получения и выращивания образцов.
6. Утилизируйте материалы, используемые для проведения данного анализа, в том числе реагенты, образцы и использованные флаконы для буферного раствора, в соответствии с федеральным, региональным и местным законодательством.

7. Sample Buffer (буферному раствору) назначаются следующие классификации:

- острая токсичность (категория 4);
- серьезное повреждение глаз (категория 1);
- поражение кожи (категория 2).

Дополнительную информацию см. в паспорте безопасности (ПБ) BioFire RP2.1 *plus*.

8. При смешивании Sample Buffer (буферного раствора) с отбеливателем и другими дезинфицирующими средствами образуются опасные соединения и пары.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: запрещено добавлять отбеливатель в Sample Buffer (буферный раствор) или отработанный образец.

9. Отбеливатель, представляющий собой рекомендуемое дезинфицирующее средство, является едким веществом, и может вызвать сильное раздражение или повреждение глаз и кожи. Испарения и мелкие брызги могут раздражать дыхательные пути. Отбеливатель вреден при проглатывании и вдыхании.

- При попадании в глаза: держать глаза открытыми и промыть водой в течение 15–20 минут. После первых 5 минут вынуть контактные линзы и продолжать промывать глаза. Обратиться за медицинской помощью.
- При попадании на кожу: в случае попадания на кожу немедленно промойте ее большим количеством воды в течение не менее 15 минут. В случае возникновения раздражения следует обратиться за медицинской помощью.
- При проглатывании: не провоцировать рвоту. Выпить стакан воды. В случае возникновения раздражения следует обратиться за медицинской помощью.
- Дополнительную информацию см. в соответствующем паспорте безопасности (ПБ).

Внутрилабораторные меры предосторожности

1. Предотвращение загрязнения микроорганизмами

Из-за высокой чувствительности BioFire RP2.1 *plus* важно защитить образец и рабочее место от загрязнения, строго следуя процессу тестирования, описанному в данной брошюре, включая следующие правила.

- Персонал лаборатории может бессимптомно переносить или распространять часто встречающиеся патогенные микроорганизмы и непреднамеренно загрязнить обрабатываемый образец. Требуется точное соблюдение шагов обработки пробы, описанное в этом документе, во избежание возможного загрязнения. Работать с образцами следует в чистом боксе биологической безопасности, если доступен, или в соответствии с местными инструкциями лаборатории. Если подобный бокс не используется, вместо него можно использовать бокс с «неподвижным воздухом» (например, рабочая станция ПЦР AirClean), защитный экран (например, Bel-Art Scienceware Splash Shields) или защитную маску во время подготовки образцов.
- Персонал лаборатории с активными респираторными симптомами (насморк, кашель) должен носить стандартную хирургическую маску (или эквивалент) и избегать прикосновения к маске при подготовке образцов.
- Рекомендуется избегать обращения с образцами или кассетами с реагентом в зоне, используемой для рутинного тестирования респираторной патогенной культуры или иммунофлуоресценции, если только предварительно не была проведена тщательная очистка этой зоны.

- Перед началом обработки образцов тщательно очистите рабочую зону и станцию Pouch Loading Station (загрузочная станция) BioFire® с помощью подходящего чистящего средства, например свежеприготовленного 10% раствора отбеливателя или аналогичного дезинфицирующего средства. Чтобы избежать скопления остатков и возможного повреждения образца или влияния дезинфицирующих средств, протирайте дезинфицированные поверхности с добавлением воды.
- Образцы и кассеты с реагентами следует обрабатывать и/или тестировать по очереди. Перед переходом к обработке следующей кассеты с реагентами и образца меняйте перчатки и очищайте рабочий стол.
- Используйте чистые перчатки при извлечении ампул с раствором Sample Buffer (буферный раствор) и флаконов Sample/Hydration Injection Vials (флаконы для внесения растворителя или флаконы для внесения образца) из упаковочных пакетов и повторно запечатывайте упаковочные пакеты, когда они не используются.
- Образцы не следует собирать и обрабатывать в местах, которые подвергаются воздействию материала вакцин для патогенов, обнаруживаемых BioFire RP2.1 plus (например, гриппа, полиовируса и *Bordetella pertussis*), если возможно. Во время сбора и обработки образцов следует соблюдать особую осторожность, чтобы избежать их загрязнения. Некоторые бесклеточные вакцины *B. pertussis* (т. е. Pentacel®, Daptacel® и Adacel®) содержат ДНК, поддающуюся обнаружению с помощью ПЦР. Загрязнение образцов или используемых при тестировании материалов с вакциной может привести к ложноположительным результатам теста на *B. pertussis* (<http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/diagnosis-pcr-bestpractices.html>).

2. Предотвращение загрязнения ампликонами

Общей проблемой при проведении анализов на основе ПЦР является получение ложноположительных результатов вследствие загрязнения рабочей зоны ампликоном ПЦР. Так как кассета BioFire RP2.1 plus является закрытой системой, риск загрязнения ампликоном низкий при условии, что кассеты будут оставаться неповрежденными после завершения теста. Чтобы избежать загрязнения ампликоном, следуйте приведенным выше и ниже рекомендациям.

- Утилизируйте использованные кассеты с реагентами в контейнер для биологически опасных отходов сразу после завершения теста.
- После завершения теста избегайте чрезмерно долгого обращения с кассетами с реагентами.
- Всегда меняйте перчатки после работы с использованной кассетой с реагентами.
- Избегайте контакта кассет с реагентами с острыми краями и другими предметами, которые могут привести к проколу.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: если на наружной поверхности кассеты с реагентами присутствует жидкость, жидкость и кассету с реагентами следует немедленно поместить в контейнер для биологически опасных отходов и утилизировать. Прибор и рабочее место следует очистить от загрязнений, как описано в соответствующем руководстве оператора FilmArray.

ЗАПРЕЩАЕТСЯ ВЫПОЛНЯТЬ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ТЕСТЫ ДО ТЕХ ПОР, ПОКА ЗОНА НЕ БУДЕТ ОЧИЩЕНА ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЙ.

Предупреждения относительно сообщений в органы здравоохранения

Местные и государственные правила уведомления о регистрируемых заболеваниях постоянно обновляются и включают ряд микроорганизмов для наблюдения и исследования вспышек.^{53,54} Кроме того, центры по контролю и профилактике заболеваний (CDC) рекомендуют лаборатории при обнаружении патогенов регистрируемых заболеваний с помощью проведения культурально-независимого диагностического теста упростить получение

изолята или клинических материалов для отправки в соответствующую санитарно-гигиеническую лабораторию для помощи в обнаружении вспышек инфекции и проведении эпидемиологических исследований. Лаборатории ответственны за соблюдение государственных и/или местных правил и должны консультироваться с местными и/или государственными санитарно-гигиеническими лабораториями для получения правил отправки изолята и/или клинического образца.

О положительных результатах на SARS-CoV-2, MERS-CoV или при подозрении на новый грипп следует сообщать в государственные, местные или федеральные органы здравоохранения в соответствии с местными требованиями к отчетности. Попытаться получить культуры вирусов в этих случаях не следует, если нет установки BSL 3 для получения и выращивания образцов.

В соответствии с местным законодательством, законодательством штата и федеральным законодательством, поставщики медицинских услуг должны немедленно сообщать в органы здравоохранения (по мере необходимости) о любом лице, проходящем обследование на предмет наличия у него инфекции MERS-CoV, если оно отвечает критериям пациента, подлежащего контролю (ППК) (<https://www.cdc.gov/coronavirus/mers/case-def.html#pui>).

Меры предосторожности, связанные с регламентом REACH (ЕС 1907/2006)

Это заявление применяется только к странам в пределах Европейского Союза (ЕС) относительно регистрации, оценки, разрешения и ограничения химических веществ (Регламент REACH) (ЕС 1907/2006):

Рекомендуется сжигать все материалы, связанные с тестом, включая материал, используемый для вытирания пролитой жидкости; загрязненную упаковку и/или неиспользованные тесты IVD с истекшим сроком годности. Обеспечьте соблюдение местных требований относительно утилизации.

ХРАНЕНИЕ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

1. Тестовый набор, включая кассеты с реагентами и буферными растворами, следует хранить при комнатной температуре (15–25°C). **НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ.**
2. Избегайте хранения любых материалов вблизи нагревательных и охлаждающих вентиляционных отверстий или под прямыми солнечными лучами.
3. Все компоненты набора должны храниться и использоваться вместе. Не используйте компоненты из одного набора вместе с компонентами из другого набора. После использования всех кассет с реагентами утилизируйте все оставшиеся компоненты набора.
4. Не извлекайте кассеты с реагентами из упаковки, пока образец не будет подготовлен к проведению теста. После вскрытия упаковки кассету следует загрузить максимально быстро (в течение приблизительно 30 минут).
5. После загрузки кассеты с реагентами следует как можно скорее начать тест (в течение приблизительно 60 минут). Не подвергайте загруженную кассету с реагентами воздействию температур выше 40°C (104°F) до тестирования.

ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦАМ

В следующей таблице описаны требования к сбору, подготовке и обработке образца, которые помогут обеспечить получение точных результатов теста.

Тип образца	Мазок из носоглотки (МНГ), собранный в соответствии со стандартной техникой и немедленно помещенный в транспортную среду в объеме до 3 мл
Минимальный объем образца	0,3 мл (300 мкл)
Транспортировка и хранение	Образцы необходимо как можно скорее обработать и протестировать с помощью BioFire RP2.1plus. Если требуется хранить образцы, их можно держать: • при комнатной температуре (15–25°C) не более 4 часов; • в холодильнике (2–8°C) до 3 дней; • в морозильной камере ($\leq -15^{\circ}\text{C}$ или $\leq -70^{\circ}\text{C}$) до 30 дней.^a

^a Для этого типа образца оценивалось хранение в замороженном виде до 30 дней. Однако может быть допустимым хранение в течение более длительного времени. Следуйте правилам и протоколам своего учреждения относительно валидации хранения образцов.



ПРИМЕЧАНИЕ. Образцы МНГ не должны быть центрифугированы перед тестированием.



ПРИМЕЧАНИЕ. Отбеливатель может повреждать организмы и нуклеиновые кислоты в образце, что может приводить к получению ложноотрицательных результатов. Во время сбора, дезинфекции, тестирования следует избегать контакта образцов с отбеливателем.

ПРОЦЕДУРА

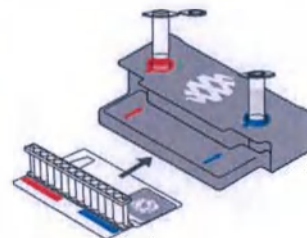
При работе с кассетами с реагентами и образцами следует использовать перчатки и другие средства индивидуальной защиты (СИЗ). Одновременно готовьте только одну кассету с реагентами BioFire RP2.1plus. Перед переходом к обработке следующей кассеты с реагентами и образца меняйте перчатки. После добавления образца кассету с реагентами следует незамедлительно поместить в прибор, чтобы начать тест. По завершении теста кассету с реагентами следует утилизировать в контейнер для биологически опасных отходов.

Этап 1. Подготовка кассеты

1. Тщательно очистите рабочую зону и станцию Pouch Loading Station (Загрузочная станция) BioFire свежеприготовленным 10%-ным раствором отбеливателя (или подходящего дезинфицирующего средства), а затем промойте их водой.
2. Извлеките кассету с реагентами из герметичной упаковки, разорвав или разрезав внешнюю упаковку с надрезом и вскрыв защитный контейнер.

ПРИМЕЧАНИЕ. Кассету с реагентами можно использовать, даже если ее вакуумная упаковка повреждена. Попробуйте внести раствор для регидратации в кассету, выполняя действия, описанные в разделе «Внесение раствора для регидратации в кассету». Если гидратация будет завершена успешно, перейдите к тесту. В случае сбоя процесса гидратации утилизируйте кассету и используйте новую для анализа образца.

3. Проверьте срок годности на кассете с реагентами. Не используйте кассеты с реагентами после истечения срока годности.
4. Вставьте кассету в станцию Pouch Loading Station (Загрузочная станция) так, чтобы красная и синяя этикетки на кассете с реагентами были совмещены с красной и синей стрелками на станции Pouch Loading Station (Загрузочная станция).
5. Поместите флакон **Sample Injection Vial (Флакон для внесения образца)** с красным колпачком в **красную лунку** станции Pouch Loading Station (Загрузочная станция).
6. Поместите **Hydration Injection Vial (Флакон для внесения растворителя)** с синим колпачком в **синюю лунку** на Pouch Loading Station (Загрузочная станция).



Этап 2. Внесение раствора для регидратации в кассету

1. Отверните флакон **Hydration Injection Vial (Флакон для внесения растворителя)** с синего колпачка.
2. Снимите флакон **Hydration Injection Vial (Флакон для внесения растворителя)**, оставив синий колпачок в станции Pouch Loading Station (Загрузочная станция) BioFire.
3. Вставьте кончик канюли **Hydration Injection Vial (Флакон для внесения растворителя)** в **порт гидратации кассеты с реагентами**, расположенный непосредственно под синей стрелкой на станции Pouch Loading Station (Загрузочная станция).
4. Быстрым и решительным движением с силой надавите вниз, пока не услышите слабый хлопок и не почувствуете облегчение сопротивления. Под действием вакуума требуемый объем раствора Hydration Solution (Регидратирующий раствор) будет втянут в кассету с реагентами.
 - Если регидратирующий раствор не будет автоматически подан в кассету с реагентами, повторите этап 2, чтобы убедиться, что герметичность **порта гидратации кассеты с реагентами** была нарушена. Если после этого регидратирующий раствор не будет подан в кассету с реагентами, утилизируйте эту кассету с реагентами, возьмите новую кассету с реагентами и повторите действия, начиная с *этапа 1, Подготовка кассеты*.
5. Убедитесь, что кассета с реагентами была гидратирована.
 - Переверните этикетку со штрихкодом вниз и убедитесь, что жидкость попала в лунки с реагентами (расположенные в основании жесткой пластмассовой части кассеты с реагентами). Могут быть видны небольшие пузырьки воздуха.
 - Если кассета с реагентами не будет гидратирована (сухие реагенты выглядят как белые гранулы), повторите этап 2, чтобы убедиться, что герметичность **порта гидратации кассеты с реагентами** была нарушена. Если после этого регидратирующий раствор все еще не будет подан в кассету с реагентами, утилизируйте эту кассету с реагентами, возьмите новую кассету с реагентами и повторите действия, начиная с *этапа 1, Подготовка кассеты*.



Этап 3. Подготовка образца

1. Добавьте Sample Buffer (Буферный раствор) в **Sample Injection Vial (Флакон для внесения образца)**.

- Удерживайте ампулу с раствором Sample Buffer (буферный раствор) так, чтобы ее кончик был направлен вверх.



ПРИМЕЧАНИЕ. Не касайтесь кончика ампулы при обращении с ней, так как это может привести к загрязнению.

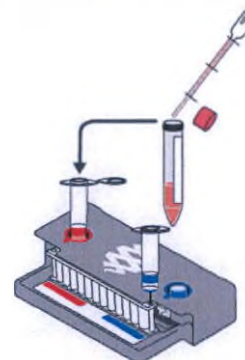
- Сильно надавите на шероховатый пластиковый выступ на боковой стороне ампулы, пока не услышите щелчок, сопровождающий разрыв герметичной упаковки.
- Переверните ампулу над флаконом **Sample Injection Vial (Флакон для внесения образца)** с красным колпачком и выдавите Sample Buffer (Буферный раствор) медленным сильным сдавливанием, после чего повторно сдавите ампулу.



ПРИМЕЧАНИЕ. Избегайте дополнительного сдавливания ампулы. Это приведет к вспениванию, которого следует избегать.

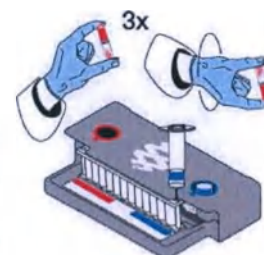
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Sample Buffer (Буферный раствор) может нанести вред здоровью при проглатывании, а также вызвать серьезное повреждение глаз и раздражение кожи.

2. Тщательно перемешайте образец МНГ в смесителе типа «вортекс» или путем переворачивания.
3. С помощью Transfer Pipette (Пипетка), имеющейся в тестовом наборе, доведите образец до третьей линии (приблизительной 0,3 мл) пипетки.
4. Добавьте образец в Sample Buffer (Буферный раствор), внесенный в **Sample Injection Vial (Флакон для внесения образца)**.
5. Плотно закройте крышку **Sample Injection Vial (Флакон для внесения образца)** и утилизируйте Transfer Pipette (Пипетка) в контейнер для биологически опасных отходов.



ПРИМЕЧАНИЕ. НЕ используйте Transfer Pipette (Пипетка) для перемешивания образца после его загрузки в **Sample Injection Vial (Флакон для внесения образца)**.

6. Извлеките флакон **Sample Injection Vial (Флакон для внесения образца)** из станции Pouch Loading Station (Загрузочная станция) и переверните флакон не менее 3 раз, чтобы перемешать раствор.
7. Верните флакон **Sample Injection Vial (Флакон для внесения образца)** в красную лунку станции Pouch Loading Station (Загрузочная станция).

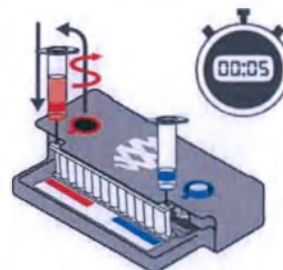


Этап 4. Загрузка смеси образца

1. Медленно поверните флакон **Sample Injection Vial** (Флакон для внесения образца), чтобы отвернуть его от красного колпачка, затем подождите 5 секунд, оставив флакон на колпачке.



ПРИМЕЧАНИЕ. 5-секундная пауза уменьшает риск падения капель и загрязнения образцом.



2. Поднимите флакон **Sample Injection Vial** (Флакон для внесения образца), оставив красный колпачок в лунке станции Pouch Loading Station (Загрузочная станция), затем вставьте кончик канюли флакона **Sample Injection Vial** (Флакон для внесения образца) в порт для образца в кассете с реагентами, расположенный непосредственно под красной стрелкой на станции Pouch Loading Station (загрузочная станция).
3. Быстрым движением с силой надавите вниз, чтобы проколоть уплотнитель (послышится слабый хлопок), после чего образец попадет в кассету с реагентами под действием вакуума.
4. Убедитесь, что образец был загружен.
 - Переверните вниз этикетку со штрихкодом и убедитесь, что жидкость заполнила лунки с реагентами рядом с портом для загрузки образцов.
 - Если втягивание образца из **Sample Injection Vial** (Флакон для внесения образца) в кассету с реагентами не происходит, кассету с реагентами следует утилизировать. Возьмите новую кассету с реагентами и повторите действия, начиная с этапа 1, Подготовка кассеты.
5. Утилизируйте **Sample Injection Vial** (Флакон для внесения образца) и **Hydration Injection Vial** (Флакон для внесения растворителя) в подходящий контейнер для биологически опасных острых отходов.
6. Запишите Sample ID (ID образца) в предусмотренное для этого место на этикетке кассеты с реагентами (или прикрепите Sample ID (ID образца) в виде штрихкода) и извлеките кассету с реагентами из станции Pouch Loading Station (Загрузочная станция) FilmArray.

Этап 5. Запуск кассеты

ПО BioFire® FilmArray® содержит выводимые на экран пошаговые инструкции, которые помогают оператору выполнить тест. Ниже приведены краткие инструкции для систем BioFire FilmArray 2.0 и BioFire FilmArray Torch. Более подробные инструкции можно найти в соответствующем руководстве пользователя системы BioFire FilmArray.

BioFire FilmArray 2.0

1. Убедитесь, что система (прибор и компьютер) включена, а ПО запущено.
2. Следуя инструкциям на экране и процедурам, описанным в руководстве пользователя, поместите кассету с реагентами в модуль, затем введите информацию о кассете с реагентами, образце, операторе.
3. Идентификатор кассеты с реагентами (Lot Number (Номер партии) и Serial Number (Серийный номер)), Pouch Type (Тип кассеты) и Protocol (Протокол) будут автоматически введены при сканировании штрихкода. Если не удастся сканировать штрихкод, Lot Number (Номер партии), Serial Number (Серийный номер), Pouch Type (Тип кассеты) и Protocol (Протокол), которые указаны на этикетке кассеты с реагентами, можно вручную ввести в соответствующие поля. Чтобы свести к минимуму ошибки ввода данных, настоятельно рекомендуется вводить информацию о кассете с реагентами путем сканирования штрихкода.

 **ПРИМЕЧАНИЕ.** При выборе *Pouch Type* (Тип кассеты) вручную убедитесь, что *Pouch Type* (Тип кассеты) соответствует значению на этикетке кассеты с реагентами *BioFire RP2.1plus*.

4. Введите Sample ID (ID образца). Sample ID (ID образца) можно ввести вручную или отсканировать с использованием сканера штрихкода при использовании штрихкода Sample ID (ID образца).
5. При необходимости выберите и/или подтвердите соответствующий протокол для типа образца в раскрывающемся списке Protocol (Протокол). *BioFire RP2.1plus* содержит один протокол, доступный в раскрывающемся списке.
6. Введите имя пользователя и пароль в соответствующих полях Name (Имя) и Password (Пароль).

 **ПРИМЕЧАНИЕ.** Имя пользователя будет отображаться красным цветом, пока не будет распознано программным обеспечением.

7. Просмотрите введенные данные теста на экране. Если все правильно, выберите Start Run (Запуск теста).

Как только тест будет запущен, на экране отобразится список этапов, выполняемых прибором, а также количество минут, оставшееся до завершения теста.

 **ПРИМЕЧАНИЕ.** В течение первой минуты работы гомогенизатор издает высокочастотный шум.

8. По завершении теста следуйте инструкциям на экране, чтобы извлечь кассету с реагентами и немедленно утилизировать ее в контейнер для биологически опасных отходов.
9. Файл теста автоматически сохранится в базе данных программного обеспечения *BioFire*, а протокол испытаний можно будет просмотреть, напечатать и/или сохранить в формате PDF.

BioFire FilmArray Torch

1. Убедитесь, что система включена.
2. На сенсорном экране выберите доступный модуль или сканируйте штрихкод на кассете с реагентами, используя сканер штрихкодов.
3. Идентификатор кассеты с реагентами (Lot Number (Номер партии) и Serial Number (Серийный номер)), *Pouch Type* (Тип кассеты) и Protocol (Протокол) будут автоматически введены при сканировании штрихкода. Если не удастся сканировать штрихкод, Lot Number (Номер партии), Serial Number (Серийный номер), *Pouch Type* (Тип кассеты) и Protocol (Протокол), которые указаны на этикетке кассеты с реагентами, можно вручную ввести в соответствующие поля. Чтобы свести к минимуму ошибки ввода данных, настоятельно рекомендуется вводить информацию о кассете с реагентами путем сканирования штрихкода.

 **ПРИМЕЧАНИЕ.** При выборе *Pouch Type* (Тип кассеты) вручную убедитесь, что *Pouch Type* (Тип кассеты) соответствует значению на этикетке кассеты с реагентами *BioFire RP2.1plus*.

4. Введите Sample ID (ID образца). Sample ID (ID образца) можно ввести вручную или отсканировать с использованием сканера штрихкода при использовании штрихкода Sample ID (ID образца).
5. Вставьте кассету с реагентами в доступный модуль.
 - Убедитесь, что этикетка на кассете с реагентами находится в верхней части кассеты и не загнута. При введении кассеты модуль захватит кассету и втянет ее в камеру.
6. При необходимости выберите и/или подтвердите соответствующий протокол для типа образца в раскрывающемся списке Protocol (Протокол). *BioFire RP2.1plus* содержит один протокол, доступный в раскрывающемся списке.

7. Введите имя пользователя и пароль оператора, затем нажмите кнопку Next (Далее).

 **ПРИМЕЧАНИЕ.** Имя пользователя будет отображаться красным цветом, пока не будет распознано программным обеспечением.

8. Просмотрите введенные данные теста на экране. Если все правильно, выберите Start Run (Запуск теста).

После запуска теста на экране появится список действий, выполняемых модулем, и оставшееся количество минут выполнения процедуры.

 **ПРИМЕЧАНИЕ.** В течение первой минуты работы гомогенизатор будет издавать высокочастотный шум.

9. По завершении теста извлеките частично вытолкнутую кассету с реагентами и немедленно утилизируйте ее в контейнер для биологически опасных отходов.

10. Файл теста автоматически сохранится в базе данных программного обеспечения BioFire, а протокол испытаний можно будет просмотреть, напечатать и/или сохранить в формате PDF.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Технологический контроль качества

В каждой кассете предусмотрены два анализа технологического контроля качества.

1. RNA Process Control (Контроль качества РНК)

Анализ RNA Process Control (Контроль качества РНК) нацелен на транскрипт РНК из дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*. Эти дрожжи присутствуют в кассете в лиофилизированной форме и при загрузке образца регидратируются. Контрольный материал проходит через все этапы процесса тестирования, включая лизис, очистку нуклеиновых кислот, обратную транскрипцию, ПЦР1, разбавление, ПЦР2, плавление ДНК. Положительный результат контроля показывает, что все действия в кассете с реагентами BioFire RP2.1plus выполнены успешно.

2. PCR2 Control (Контроль качества ПЦР2)

Анализ PCR2 Control (Контроль качества ПЦР2) обнаруживает ДНК-мишень, которая высохла в лунках набора вместе с соответствующими праймерами. Положительный результат свидетельствует об успешном выполнении ПЦР2.

Для успешного выполнения тестирования оба контрольных анализа должны иметь положительные результаты. При получении отрицательного результата технологического контроля необходимо повторно протестировать образец с новой кассетой с реагентами.

Мониторинг производительности тест-системы

Программное обеспечение автоматически прекращает тест, если температура плавления (T_m) для RNA Process Control (Контроль качества РНК) или PCR2 Control (Контроль качества ПЦР2) находится за пределами допустимого диапазона (80,3–84,3°C для RNA Process Control (Контроль качества РНК) и 73,8–77,8°C для PCR2 Control (Контроль качества ПЦР2)). В случае, если существуют требования к контролю качества на местном или штатном уровне либо требования аккредитованной организации, пользователи могут осуществлять мониторинг системы путем изменения значений T_m для анализов контроля качества и ведения учета в соответствии со стандартной лабораторной практикой контроля качества.^{56,57} Инструкции по получению значений T_m контрольного анализа см. в соответствующем руководстве пользователя FilmArray BioFire. PCR2 Control (Контроль качества ПЦР2) используется в нескольких типах кассет с реагентами (например, RP2.1, BCID2, GI и ME) и поэтому может использоваться для мониторинга системы при использовании нескольких типов кассет с реагентами в одной системе FilmArray.

Внешний контроль

Внешний контроль следует использовать в соответствии с лабораторными регламентами или надлежащими требованиями аккредитованной организации в зависимости от обстоятельств. Транспортная среда может использоваться в качестве внешнего отрицательного контроля. Для внешнего положительного контроля можно использовать ранее охарактеризованные положительные образцы или отрицательные образцы с хорошо охарактеризованными микроорганизмами. Можно также использовать доступные в продаже контрольные материалы других производителей; их следует использовать в соответствии с инструкциями производителей и требованиями соответствующих аккредитующих организаций, если применимо.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретация результатов анализа

После завершения ПЦР2 прибор выполняет анализ кривой плавления ДНК высокого разрешения для продуктов ПЦР и измеряет флуоресцентный сигнал, генерируемый в каждой лунке (более детальную информацию см. в соответствующем руководстве пользователя системы BioFire FilmArray). Затем ПО BioFire FilmArray выполнит несколько анализов и выдаст конечные результаты анализа. Этапы анализа описаны ниже.

Анализ кривых плавления. Программное обеспечение BioFire FilmArray анализирует кривую плавления ДНК для каждой лунки диска ПЦР2, чтобы определить, присутствовал ли в этой лунке какой-нибудь продукт ПЦР. Если профиль плавления укажет на наличие продукта ПЦР, ПО анализа вычислит температуру плавления (T_m) кривой и сравнит ее с предполагаемым диапазоном T_m для анализа. Если ПО определяет, что T_m кривой попадает в диапазон T_m , характерный для анализа, кривая плавления называется положительной. Если ПО определяет, что кривая плавления не попадает в требуемый диапазон T_m , кривая плавления называется отрицательной.

Анализ повторностей. После определения кривых плавления ПО оценивает три повторности для каждого анализа, чтобы определить результаты анализа. Для того чтобы анализ был сочтен положительным, по меньшей мере две из трех соответствующих кривых плавления должны быть положительными и T_m , по меньшей мере, двух из трех положительных кривых плавления должны совпадать (в пределах 1°C). Анализы, которые не соответствуют этим критериям, называются отрицательными.

Интерпретация микроорганизмов

Для большинства обнаруживаемых микроорганизмов BioFire RP2.1plus выводит результат Detected (Обнаружен), если один соответствующий анализ является положительным. Например, для метапневмовируса человека будет получен результат анализа Human Metapneumovirus Detected (Обнаружен метапневмовирус человека), если анализ hMPV положительный (крайней мере, в двух из трех лунок анализа hMPV в наборе реагентов будут схожие пики плавления со значениями T_m , лежащими в пределах соответствующего данному анализу диапазона T_m). Результаты теста на аденовирус, грипп А, MERS-CoV и SARS-CoV-2 зависят от интерпретации результатов более, чем одного анализа. Интерпретации и действия для результатов, принадлежащих нескольким анализам, приведены ниже.

Adenovirus (Аденовирус)

Кассета с реагентами BioFire RP2.1plus содержит пять анализов (Adeno2, Adeno3, Adeno6, Adeno7.1 и Adeno8) для обнаружения аденовируса. Программное обеспечение BioFire FilmArray интерпретирует каждый из этих анализов независимо (как описано выше), и результаты объединяются в качестве конечного результата теста на вирус. Если один из этих анализов или любая комбинация анализов являются положительными, протокол испытаний будет иметь результат Adenovirus Detected (Аденовирус обнаружен). Если все анализы отрицательны, протокол испытаний будет иметь результат Adenovirus Not Detected (Аденовирус не обнаружен).

Грипп А

Анализы в BioFire RP2.1plus предназначены для обнаружения вируса гриппа А и дифференцирования распространенных подтипов гемагглютинаина. Для достижения этой цели в BioFire RP2.1plus используется два анализа на вирус гриппа А (FluA-pan-1 и FluA-pan-2) и три анализа на подтипы, направленные на ген гемагглютинаина (FluA-H1-2-pan, FluA-H1-2009 и FluA-H3). Все отдельные анализы интерпретируются независимо друг от друга (как описано выше), а результат теста, указанный для вируса гриппа А, основан на объединенных

результатах пяти анализов, как описано в Табл. 2. Образцы с результатом Equivocal (Сомнительный) или несколькими обнаруженными подтипами гриппа А следует тестировать повторно еще раз.

Табл. 2. Возможные результаты анализа на вирус гриппа А и соответствующие интерпретации

Результат	Анализ	Анализы FluA-pan (n=2)	FluA-H1-2	FluA-H1-2009	FluA-H3	Действие
Вирус гриппа А не обнаружен		Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Нет
Грипп А Н1		≥1 положительных	Положительный	Отрицательный	Отрицательный	
Грипп А Н3		≥1 положительных	Отрицательный	Отрицательный	Положительный	
Грипп А Н1-2009		≥1 положительных	Любой результат	Положительный	Отрицательный	
Грипп А Н1 Грипп А Н3		≥1 положительных	Положительный	Отрицательный	Положительный	Возможны несколько инфекций, но редко ^а , повторите тест для подтверждения результата ^б
Грипп А Н1-2009 Грипп А Н3		≥1 положительных	Любой результат	Положительный	Положительный	
Грипп А (подтипы не обнаружены)		2 положительных	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Повторное испытание (см. ниже)
Грипп А: Equivocal (сомнительный)		1 положительный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Повторное испытание еще один раз (Дополнительные инструкции см. в разделе Result Summary (Обзор результатов) ниже).
Грипп А Н1: Equivocal (сомнительный)		Отрицательный	Положительный	Отрицательный	Отрицательный	
Грипп А Н3: Equivocal (сомнительный)		Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Положительный	
Грипп А Н1-2009: Equivocal (сомнительный)		Отрицательный	Любой результат	Положительный	Отрицательный	

^а BioFire RP2.1plus может одновременно обнаруживать несколько вирусов гриппа, содержащихся в поливалентных вакцинах (см. «Ограничения»).

^б Повторные множественные положительные результаты для подтипов следует дополнительно подтверждать другими утвержденными тестами на подтипы гриппа.

Influenza A (no subtype detected) (Грипп А (подтипы не обнаружены))

Если результаты обоих анализов FluA-pan являются положительными, но результат ни одного из анализов на подтипы гемагглютинина не является положительным, то результат интерпретируется как Influenza A (no subtype detected) (вирус гриппа А (подтипы не обнаружены)). Этот результат может быть получен, когда титр вируса в образце низок и не обнаруживается с помощью анализа на подтипы. Этот результат может также указывать на наличие нового штамма вируса гриппа А. В обоих случаях рассматриваемый образец следует тестировать повторно. Если повторный тест даст другой результат, то следует протестировать образец в третий раз, чтобы обеспечить точность результата. Если повторный тест даст тот же результат, то следует проверить работу кассет с реагентами BioFire RP2.1plus путем тестирования с помощью соответствующих внешних контрольных материалов (известных положительных образцов для вируса гриппа А Н1, вируса гриппа А Н3 и вируса гриппа А Н1-2009), а также следует выполнить отрицательный контроль, чтобы выполнить тест на загрязнение продуктов ПЦР. Если BioFire RP2.1plus точно идентифицирует внешние и отрицательные контроли, то обратитесь в соответствующие органы здравоохранения за подтверждающим тестированием.

MERS-CoV

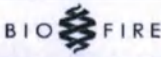
Кассета с реагентами BioFire RP2.1*plus* содержит два различных анализа для обнаружения MERS-CoV. Один анализ нацелен на ген мембранного белка (M) (анализ MERS1), а другой — на ген оболочечного белка (E) (анализ MERS2). Программное обеспечение BioFire интерпретирует каждый из этих анализов независимо, и результаты объединяются в качестве конечного результата теста на вирус. Для получения в качестве протокола испытаний значения Detected (Обнаружен) оба анализа должны быть положительными. Если положителен только один анализ, результат признается Equivocal (сомнительным), поэтому следует повторить тестирование образца. Если оба анализа отрицательны, протокол испытаний будет иметь результат Not Detected (Не обнаружен).

SARS-CoV-2

Кассета с реагентами BioFire RP2.1*plus* содержит два различных анализа для обнаружения SARS-CoV-2. Один анализ нацелен на ген спайк-белка (S) (анализ SARSCoV2-1), а другой — на ген мембранного белка (M) (анализ SARS-CoV2-2). ПО BioFire интерпретирует каждый анализ независимо, и если один или оба анализа являются положительными, протокол испытаний покажет, что коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) Detected (Обнаружен). Если оба анализа отрицательные, протокол испытаний покажет, что коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) Not Detected (Не обнаружен).

Протокол испытаний BioFire RP2.1*plus*

Протокол испытаний BioFire RP2.1*plus* автоматически отображается по завершении теста; его можно распечатать или сохранить в файл PDF. Каждый протокол содержит разделы Run Summary (Обзор теста), Result Summary (Обзор результатов) и Run Details (Детали теста).

 BioFire® Respiratory Panel 2.1 <i>plus</i>		 www.BioFireDx.com	
Run Summary			
Sample ID:	Example Report	Run Date:	08 Dec 2015 12:00 AM
Detected:	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)	Controls:	Passed
Equivocal:	• Influenza A		
Result Summary			
Viruses			
Not Detected	Adenovirus		
Not Detected	Coronavirus 229E		
Not Detected	Coronavirus HKU1		
Not Detected	Coronavirus NL63		
Not Detected	Coronavirus OC43		
Not Detected	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)		
✓ Detected	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)		
Not Detected	Human Metapneumovirus		
Not Detected	Human Rhinovirus/Enterovirus		
• Equivocal	Influenza A		
Not Detected	Influenza B		
Not Detected	Parainfluenza Virus 1		
Not Detected	Parainfluenza Virus 2		
Not Detected	Parainfluenza Virus 3		
Not Detected	Parainfluenza Virus 4		
Not Detected	Respiratory Syncytial Virus		
Bacteria			
Not Detected	<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)		
Not Detected	<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)		
Not Detected	<i>Chlamydia pneumoniae</i>		
Not Detected	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		
Run Details			
Pouch:	RP2.1 <i>plus</i> v1.0	Protocol:	NPS2 v3.2
Run Status:	Completed	Operator:	Anonymous
Serial No.:	01234567	Instrument:	FA0000
Lot No.:	012345		

Run Summary (Обзор теста)

Раздел **Run Summary (Обзор теста)** протокола испытаний содержит Sample ID (ID образца), время и дату проведения теста, результаты контроля и общий итог результатов теста. Любой микроорганизм с результатом Detected (Обнаружен) будет внесен в соответствующее поле отчета. Если результаты всех анализов для определения микроорганизмов были отрицательными, в поле Detected (Обнаружен) будет указано None (Нет). Controls (Контроли) указываются как Passed (Пройден), Failed (Не пройден) или Invalid (Недействителен). В Табл. 3 содержится дополнительная информация по каждому из возможных результатов в поле контроля.

Табл. 3. Интерпретация поля Controls (Контроли) в протоколе испытаний BioFire RP2.1plus

Результат контроля	Объяснение	Действие
Passed (Пройден)	Тест выполнен успешно И Оба анализа контроля качества кассет выполнены успешно.	Нет Сообщите результаты, представленные в протоколе испытаний
Failed (Не пройден)	Тест выполнен успешно НО Как минимум один контроль кассеты (RNA Process Control (Контроль качества РНК) и/или PCR2 Control (Контроль ПЦР2)) не был успешным.	Повторите тест с помощью новой кассеты с реагентами. Если ошибка сохраняется, обратитесь в службу технической поддержки для получения дальнейших указаний.
Invalid (Недействителен)	Контроли недействительны, потому что тест не был завершен. (Как правило, это свидетельствует об ошибке ПО или оборудования).	Запишите все коды ошибок, которые отображаются на дисплее в ходе теста, а также данные поля Run Status (Статус теста) в разделе протокола Run Details (Детали теста). Дополнительные инструкции см. в соответствующем руководстве пользователя FilmArray или обратитесь в службу технической поддержки. После того как ошибка будет устранена, повторите тест в том же виде или с помощью другого прибора.

Result Summary (Обзор результатов)

В разделе **Result Summary (Обзор результатов)** протокола испытаний указываются результаты для всех протестированных с помощью панели целей. Для каждого микроорганизма возможны следующие результаты: Detected (Обнаружен), Not Detected (Не обнаружен) или Invalid (Недействителен) (также возможен результат Equivocal (Сомнительный) для гриппа А и его подтипов, а также MERS-CoV) В Табл. 4 содержится описание каждой интерпретации и последующие действия, необходимые для получения конечного результата.

Табл. 4. Сообщение результатов и необходимые действия

Результат	Объяснение	Действие
Detected ^a (Обнаружен)	Тест выполнен успешно И Контрольные тесты кассеты выполнены успешно (Passed (Пройден)) И результаты анализов на микроорганизмы были POSITIVE (ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ) (т.е. отвечали требованиям к положительному результату, описанным в разделе «Интерпретация полученных результатов» выше)	Сообщите результаты.
Not Detected (Не обнаружен)	Тест выполнен успешно И Контрольные тесты кассеты выполнены успешно (Passed (Пройден)) И результаты анализов на микроорганизмы были NEGATIVE (ОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ) (т.е. не отвечали требованиям к положительному результату, описанным в разделе «Интерпретация полученных результатов» выше)	Сообщите результаты.
Equivocal (Сомнительный) (только грипп А и MERS-CoV)	Тест выполнен успешно И Контрольные тесты кассеты выполнены успешно (Passed (Пройден)) И Сочетание положительных и отрицательных результатов анализа на вирус гриппа А (см. Табл. 2) и/или MERS-CoV не позволило сделать окончательный вывод	Повторно протестируйте оригинальный образец и сообщите результат. Если результат повторного тестирования снова Equivocal (Сомнительный), окончательный результат следует считать Detected (Обнаружен).
Invalid (Недействителен)	Контрольные тесты кассеты выполнены неудачно (Failed (Не пройден)) ИЛИ тест закончился неудачей (Run Status (Статус теста) отображается следующим образом: Aborted (Остановлено), Incomplete (Незавершенный), Instrument Error (Ошибка прибора) или Software Error (Ошибка ПО))	См. инструкции в Табл. 3 «Интерпретация поля Control (Контроль) в протоколе испытаний FilmArray».

^a При обнаружении в образце четырех или более микроорганизмов рекомендуется повторно провести тестирование для подтверждения полимикробного результата.

Run Details (Детали теста)

Раздел **Run Details (Детали теста)** предоставляет дополнительную информацию о тесте, в том числе: данные о кассете (тип, номер партии и серийный номер), Run Status (статус теста) (Completed (завершен), Incomplete (незавершенный), Aborted (остановлено), Instrument Error (ошибка прибора) или Software Error (ошибка ПО)), протокол, который был использован для выполнения теста, данные оператора, который выполнил тест, а также инструмент, использованный для выполнения теста.

Change Summary (Обзор изменений)

По завершении теста можно изменить Sample ID (ID образца). Если эти данные были изменены, дополнительный раздел **Change Summary (Обзор изменений)** будет добавлен в протокол испытаний. В данном разделе Change Summary (Обзор изменений) указывается поле, в которое внесли изменения, первичная запись, исправленная запись, оператор, который внес изменения, а также дата внесения этого изменения. Sample ID (ID образца) — это единственное поле отчета, которое можно изменить.

Change Summary				
Field	Changed To	Changed From	Operator	Date
Sample ID	New Example Id	Old Example Id	Anonymous	06 Apr 2020

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Эффективность BioFire RP2.1*plus* установлена только на системах FilmArray 2.0 и FilmArray Torch производства BioFire.
2. Тест BioFire RP2.1*plus* является качественным и не определяет количественное значение микроорганизмов в образце.
3. Результаты этого теста должны быть соотнесены с анамнезом болезни, эпидемиологическими данными (например, наличием в анамнезе поездки или контакта с вероятным или подтвержденным случаем MERS-CoV), а также другими данными, доступными врачу, проводящему оценку пациента.
4. Оценка эффективности теста BioFire RP2.1*plus* выполнена только для случая использования с материалом образцов, взятых у человека.
5. Тест BioFire RP2.1*plus* не проходил валидацию на предмет тестирования образцов, отличных от образцов мазков из носоглотки (МНГ) в транспортной среде.
6. Эффективность BioFire RP2.1*plus* для образцов, взятых у пациентов без признаков или симптомов респираторной инфекции дыхательных путей, не установлена.
7. Эффективность BioFire RP2.1*plus* не оценивалась специально для образцов МНГ пациентов с ослабленным иммунитетом.
8. Воздействие лечения антибиотиками на эффективность теста не оценивалось.
9. Эффективность BioFire RP2.1*plus* с потенциально интерферирующими лекарственными препаратами для лечения вирусов гриппа или простуды не установлена. Оценка влияния интерферирующих веществ была выполнена только для веществ, перечисленных в разделе *Интерференция*. Интерференция веществ, которые не оценивались, может привести к ошибочным результатам.
10. Эффективность BioFire RP2.1*plus* этого теста не установлена для наблюдательного лечения инфекции с любым из внутритестовых микроорганизмов.
11. Эффективность BioFire RP2.1*plus* не установлена для скрининга крови и продуктов крови.
12. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты могут быть иметь разнообразные источники и причины. Важно использовать эти результаты в сочетании с другой клинической, эпидемиологической или лабораторной информацией.
13. Обнаружение вирусной и бактериальной нуклеиновой кислоты зависит от правильного сбора, транспортировки, хранения и подготовки образцов и обращения с ними. Несоблюдение надлежащих процедур на любом из этих этапов может привести к неверным результатам. Существует риск получения ложноположительных или ложноотрицательных значений в результате неправильного сбора и транспортировки образцов или обращения с ними.
14. Отрицательный результат BioFire RP2.1*plus* не исключает возможности вирусной или бактериальной инфекции. Отрицательные результаты тестов могут быть получены вследствие наличия вариантов последовательностей (или мутации) в целевой области теста; наличия ингибиторов; технической ошибки; смешивания образцов; инфекции, вызванной микроорганизмом, не обнаруженным панелью; инфекции

нижних дыхательных путей, не обнаруживаемой образцом МНГ. На результаты теста также может повлиять одновременная противовирусная и антибактериальная терапия или содержание микроорганизма в образце ниже предела обнаружения для данного теста. Отрицательные результаты не должны использоваться в качестве исключительной основы для постановки диагноза, проведения лечения или других решений касательно пациента.

15. При обнаружении в образце четырех или более микроорганизмов рекомендуется повторно провести тестирование для подтверждения полимикробного результата.

16. Вирусные и бактериальные нуклеиновые кислоты могут сохраняться *in vivo* независимо от жизнеспособности микроорганизма. Обнаружение микроорганизмов-мишеней не означает, что соответствующие микроорганизмы являются заразными или являются причиной клинических симптомов.

17. Положительные и отрицательные прогностические значения в значительной степени зависят от распространенности. Ложноотрицательные результаты тестов наиболее вероятны во время пиковой активности, когда распространенность заболевания высока. Ложноположительные результаты тестов наиболее вероятны в периоды, когда распространенность умеренная или низкая.

18. Эффективность обнаружения вируса гриппа А была установлена, когда наиболее распространенными циркулирующими вирусами гриппа А были А Н1-2009, А Н1 и А Н3. Эффективность обнаружения вируса гриппа А может меняться, если циркулируют и другие штаммы вируса гриппа А или появляется новый вирус гриппа А.

19. Из-за того, что число образцов некоторых микроорганизмов, собранных во время проспективного клинического исследования, мало, эффективность обнаружения *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, коронавируса 229Е, вируса гриппа А Н1, вируса гриппа А Н3, вируса гриппа В, вируса парагриппа 1 и вируса парагриппа 4 была установлена, в основном, с помощью ретроспективных клинических образцов. Эффективность обнаружения вируса гриппа А Н1 и MERS-CoV была установлена в первую очередь с помощью суррогатных клинических образцов.

20. Проспективные показатели клинической производительности были получены для выборки, в которой не наблюдалось циркуляции MERS-CoV.

21. Анализы теста BioFire RP2.1*plus* на подтипы вируса гриппа А нацелены только на определение гена гемагглютинина (Н) вируса гриппа А. BioFire RP2.1*plus* не обнаруживает и не дифференцирует подтипы нейраминидазы (N) вируса гриппа А.

22. BioFire RP2.1*plus*, возможно, не сможет различать существующие вирусные штаммы и новые варианты по мере их появления. Например, BioFire RP2.1*plus* может обнаружить вирус гриппа А Н3N2v (впервые обнаруженный в августе 2011 г.), но не сможет отличить этот вариант от сезонного вируса гриппа А Н3N2. Если обнаружен вариант вирусной инфекции, врачам следует обратиться в региональное или местное управление здравоохранения для организации транспортировки образца и запроса проведения своевременной диагностики в государственной санитарно-гигиенической лаборатории.

23. Введение интраназальных вакцин против гриппа (например, FluMist) незадолго перед сбором образцов МНГ может привести к обнаружению вирусов, содержащихся в вакцине, с помощью набора BioFire RP2.1, но не свидетельствует о наличии инфекции, вызванной указанными возбудителями.

24. Вследствие генетического сходства между человеческим риновирусом и энтеровирусом BioFire RP2.1*plus* не позволяет достоверно определить различия между ними. Если необходимо точно определить вирус, результат Detected (Определен) теста BioFire RP2.1*plus* на риновирус или энтеровирус следует проверить с помощью альтернативного метода (например, анализа культуры клеток или секвенирования).

25. Тест BioFire RP2.1*plus* обнаруживает однокопийный целевой промотор коклюшного токсина (*ptxP*, присутствует в одной копии на клетку) в *B. pertussis*. Другие тесты ПЦР для обнаружения *B. pertussis* имеют в качестве мишени многокопийную вставочную последовательность IS481 (присутствующую как в *B.*

pertussis, так и в *B. holmesii*) и поэтому способны обнаруживать более низкие уровни *B. pertussis* (то есть являются более чувствительными).

- BioFire RP2.1*plus* не следует использовать, если есть подозрения наличия именно инфекции *B. pertussis*; вместо этого следует использовать молекулярный тест *B. pertussis*, одобренный для применения у пациентов с подозрением на инфекцию дыхательных путей, вызываемую только *B. pertussis*.
- В результате более низкой чувствительности тест на *B. pertussis* BioFire RP2.1*plus* менее чувствителен к обнаружению очень низких уровней загрязнения материалом вакцины *B. pertussis* по сравнению с тестами на IS481. Несмотря на это, необходимо всегда соблюдать осторожность во избежание загрязнения образцов материалом вакцины, поскольку более высокие уровни по-прежнему могут привести к получению ложноположительных результатов при тестировании с помощью BioFire RP2.1*plus* (см. рекомендации по предотвращению загрязнения).
- Последовательность IS481 также присутствует в *B. holmesii* и в меньшей степени в *B. bronchiseptica*, тогда как анализ BioFire RP2.1*plus* (*ptxP*) был разработан для определения именно *B. pertussis*. Однако возможна амплификация при анализе BioFire RP2.1*plus* *Bordetella pertussis* (*ptxP*) последовательностей псевдогена токсина коклюша в *B. bronchiseptica* и *B. parapertussis*. Перекрестная реактивность наблюдалась только при высокой концентрации (например, $\geq 1,2 \times 10^9$ КОЕ/мл).

26. Существует риск получения ложноположительных результатов вследствие перекрестного загрязнения микроорганизмами, нуклеиновыми кислотами, материалом вакцины или продуктами амплификации. Особое внимание следует уделить *Внутрилабораторные меры предосторожности*, которые приводятся в разделе *Предупреждения и меры предосторожности*.

27. Существует риск ложноположительных результатов вследствие неспецифической амплификации и перекрестной реактивности с микроорганизмами, обнаруженными в дыхательных путях. Определенная и прогнозируемая перекрестная реактивность BioFire RP2.1*plus* описана в разделе *Аналитическая специфичность (перекрестная реактивность)*. Есть риск получения ошибочных результатов вследствие перекрестной реактивности с микроорганизмами, которые не оценивались, или возникшими новыми последовательностями.

28. Праймеры для обоих анализов BioFire RP2.1*plus* SARS-CoV-2 имеют значительную гомологию последовательностей с коронавирусом летучей мыши RaTG13 (учетный номер последовательности: MN996532), и прогнозируется перекрестная реактивность с этой близкородственной вирусной последовательностью. Кроме того, анализ SARS-CoV-2 может перекрестно реагировать с последовательностями коронавируса панголина (учетный номер последовательности: MT084071) и двух других SARS-подобных коронавирусов летучей мыши (учетный номер последовательности MG772933 и MG772934). Маловероятно, чтобы эти вирусы были обнаружены в клинических мазках из носоглотки человека; но в случае их наличия, продукты перекрестной реакции, производимые BioFire RP2.1*plus*, будут обнаружены как коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) (см. раздел *Аналитическая специфичность (перекрестная реактивность)*).

29. Некоторые штаммы *B. bronchiseptica* (редко выделяемые у человека) действительно содержат вставочные последовательности IS1001, идентичные содержащимся в большинстве штаммов *B. parapertussis*. Такие последовательности будут амплифицированы анализом на IS1001 и определены тестом BioFire RP2.1*plus* в качестве *Bordetella parapertussis* (IS1001).

30. Тест на риновирус и энтеровирус человека BioFire RP2.1*plus* может амплифицировать нецелевые последовательности, обнаруженные в штаммах *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* и *B. parapertussis*. Перекрестная реактивность с участием *B. pertussis* наблюдалась при концентрациях $\geq 4,5 \times 10^7$ КОЕ/мл.

BIOFIRE RP2.1PLUS И FilmArray RP2plus

Панель BioFire RP2.1plus (каталожный номер: 423740) была разработана путем добавления реагентов, необходимых для обнаружения мишеней SARS-CoV-2, в существующий набор реагентов FilmArray Respiratory Panel 2 plus (RP2plus) производства BioFire (каталожный номер: RFIT-ASY-0136, RFIT-ASY-0137) (далее по тексту FilmArray RP2plus). Анализы на все аналиты общие между двумя панелями, и реакционные условия теста не были изменены для FilmArray RP2plus. Были проведены исследования для демонстрации эффективности новых анализов SARS-CoV-2 и для демонстрации того, что эффективность обнаружения для анализов из FilmArray RP2plus не затрагиваются модификацией панели. Оригинальные исследования FilmArray RP2plus остаются релевантными в отношении эффективности FilmArray RP2plus.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В рамках проспективной клинической оценки оригинальной панели FilmArray RP2plus были собраны и протестированы 1612 подходящих образцов (МНГ), включая 918 проспективных свежих образцов (категория I) и 694 проспективных архивных и замороженных образца (категория II), в трех исследовательских центрах на территории США на протяжении приблизительно шести месяцев (с января по март и с сентября по ноябрь 2016 г.). Суммарные ожидаемые значения (как определено FilmArray RP2plus) для образцов категории I и II соответственно, аттестированные по центрам сбора образцов, представлены в таблицах Таблица 5 и Таблица 6.



ПРИМЕЧАНИЕ. Ожидаемые значения для SARS-CoV-2 не определены.

Таблица 5. Суммарные ожидаемые значения (как определено FilmArray RP2plus) по центрам сбора для проспективной клинической оценки FilmArray RP2plus (проспективные свежие образцы категории I) (с сентября 2016 г. по ноябрь 2016 г.)

	Всего (n = 918)		Центр 1 (n = 331) Salt Lake City, UT		Центр 2 (n = 284) Chicago, IL		Центр 3 (n = 303) Columbus, OH	
	Кол-во	Ожидаемое значение (%)	Кол-во	Ожидаемое значение (%)	Кол-во	Ожидаемое значение (%)	Кол-во	Ожидаемое значение (%)
Вирусы								
Аденовирус	66	7,2%	25	7,6%	7	2,5%	34	11,2%
CoV-229E	9	1,0%	4	1,2%	5	1,8%	0	0%
CoV-HKU1	1	0,1%	0	0%	1	0,4%	0	0%
CoV-NL63	1	0,1%	0	0%	0	0%	1	0,3%
CoV-OC43	12	1,3%	4	1,2%	1	0,4%	7	2,3%
hMPV	5	0,5%	2	0,6%	2	0,7%	1	0,3%
HRV/EV	378	41,2%	146	44,1%	69	24,3%	163	53,8%
Грипп А	3	0,3%	2	0,6%	0	0%	1	0,3%
Грипп А Н1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Грипп А 2009-Н1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Грипп А Н3	3	0,3%	2	0,6%	0	0%	1	0,3%
Грипп В	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV)	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Вирус парагриппа 1	5	0,5%	3	0,9%	2	0,7%	0	0%
Вирус парагриппа 2	54	5,9%	8	2,4%	13	4,6%	33	10,9%
Вирус парагриппа 3	49	5,3%	20	6,0%	13	4,6%	16	5,3%
Вирус парагриппа 4	8	0,9%	3	0,9%	1	0,4%	4	1,3%
RSV	50	5,4%	9	2,7%	5	1,8%	36	11,9%

	Всего (n = 918)		Центр 1 (n = 331) Salt Lake City, UT		Центр 2 (n = 284) Chicago, IL		Центр 3 (n = 303) Columbus, OH	
	Кол-во	Ожидаемое значение (%)	Кол-во	Ожидаемое значение (%)	Кол-во	Ожидаемое значение (%)	Кол-во	Ожидаемое значение (%)
Бактерии								
<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)	4	0,4%	0	0%	0	0%	4	1,3%
<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)	3	0,3%	1	0,3%	0	0%	2	0,7%
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	3	0,3%	1	0,3%	0	0%	2	0,7%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	21	2,3%	2	0,6%	7	2,5%	12	4,0%

Таблица 6. Суммарные ожидаемые значения (как определено FilmArray RP2plus) по центрам сбора для проспективной клинической оценки FilmArray RP2plus (проспективные архивные образцы категории II) (с января 2016 г. по март 2016 г.)

	Всего (n = 694)		Центр 1 (n = 250) Salt Lake City, UT		Центр 2 (n = 243) Chicago, IL		Центр 3 (n = 201) Columbus, OH	
	Кол-во	Ожидаемое значение (%)	Кол-во	Ожидаемое значение (%)	Кол-во	Ожидаемое значение (%)	Кол-во	Ожидаемое значение (%)
Вирусы								
Аденовирус	52	7,5%	18	7,2%	20	8,2%	14	7,0%
CoV-229E	7	1,0%	2	0,8%	3	1,2%	2	1,0%
CoV-HKU1	54	7,8%	28	11,2%	16	6,6%	10	5,0%
CoV-NL63	49	7,1%	24	9,6%	17	7,0%	8	4,0%
CoV-OC43	26	3,7%	8	3,2%	10	4,1%	8	4,0%
hMPV	76	11,0%	26	10,4%	25	10,3%	25	12,4%
HRV/EV	124	17,9%	43	17,2%	44	18,1%	37	18,4%
Грипп А	75	10,8%	9	3,6%	27	11,1%	38	18,9%
Грипп А Н1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Грипп А 2009-Н1	74	10,7%	9	3,6%	27	11,1%	38	18,9%
Грипп А Н3	1	0,1%	0	0%	0	0%	1	0,5%
Грипп В	16	2,3%	3	1,2%	7	2,9%	6	3,0%
Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV)	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Вирус парагриппа 1	5	0,7%	2	0,8%	2	0,8%	1	0,5%
Вирус парагриппа 2	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Вирус парагриппа 3	4	0,6%	2	0,8%	0	0%	2	1,0%
Вирус парагриппа 4	8	1,2%	4	1,6%	2	0,8%	2	1,0%
RSV	149	21,5%	59	23,6%	51	21,0%	39	19,4%
Бактерии								
<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)	2	0,3%	1	0,4%	1	0,4%	0	0%
<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	3	0,4%	0	0%	2	0,8%	1	0,5%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	7	1,0%	3	1,2%	4	1,6%	0	0%

Суммарные ожидаемые значения (как определено FilmArray RP2plus) по возрастным группам для проспективной клинической оценки FilmArray RP2plus (совокупные проспективные образцы категории I и II) (с января по март и с сентября по ноябрь 2016 г.) представлены в Таблица 7.

Таблица 7. Суммарные ожидаемые значения (как определено FilmArray RP2plus) по возрастным группам для проспективной клинической оценки FilmArray RP2plus (проспективные образцы категории I и II) (с января по март и с сентября по ноябрь

	Всего (N = 1612)		≤5 лет (N = 885)		6 лет–21 год (N = 331)		22 года–49 лет (N = 128)		50 и более лет (N = 268)	
Вирусы										
Аденовирус	118	7,3%	96	10,8%	18	5,4%	2	1,6%	2	0,7%
CoV-229E	16	1,0%	3	0,3%	7	2,1%	1	0,8%	5	1,9%
CoV-HKU1	55	3,4%	37	4,2%	9	2,7%	2	1,6%	7	2,6%
CoV-NL63	50	3,1%	41	4,6%	6	1,8%	2	1,6%	1	0,4%
CoV-OC43	38	2,4%	28	3,2%	7	2,1%	0	0%	3	1,1%
hMPV	81	5,0%	60	6,8%	12	3,6%	3	2,3%	6	2,2%
HRV/EV	502	31,1%	379	42,8%	88	26,6%	16	12,5%	19	7,1%
Грипп А	78	4,8%	29	3,3%	20	6,0%	13	10,2%	16	6,0%
Грипп А Н1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Грипп А 2009-Н1	74	4,6%	26	2,9%	19	5,7%	13	10,2%	16	6,0%
Грипп А Н3	4	0,2%	3	0,3%	1	0,3%	0	0%	0	0%
Грипп В	16	1,0%	7	0,8%	7	2,1%	1	0,8%	1	0,4%
Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV)	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Вирус парагриппа 1	10	0,6%	9	1,0%	0	0%	1	0,8%	0	0%
Вирус парагриппа 2	54	3,3%	39	4,4%	10	3,0%	1	0,8%	4	1,5%
Вирус парагриппа 3	53	3,3%	44	5,0%	6	1,8%	2	1,6%	1	0,4%
Вирус парагриппа 4	16	1,0%	13	1,5%	1	0,3%	0	0%	2	0,7%
RSV	199	12,3%	168	19,0%	10	3,0%	8	6,3%	13	4,9%
Бактерии										
<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)	6	0,4%	4	0,5%	2	0,6%	0	0%	0	0%
<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)	3	0,2%	0	0%	3	0,9%	0	0%	0	0%
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	6	0,4%	1	0,1%	4	1,2%	1	0,8%	0	0%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	28	1,7%	10	1,1%	14	4,2%	3	2,3%	1	0,4%

Кроме того, наиболее распространенные множественные обнаружения (как определено FilmArray RP2plus) в ходе проспективной клинической оценки FilmArray RP2plus (совокупные проспективные образцы категории I и II) (с января по март и с сентября по ноябрь 2016 г.), стратифицированные по возрастной группе, представлены в таблице Таблица 8. Всего с помощью теста FilmArray RP2plus был обнаружен по меньшей мере один организм среди общего числа в 1020 образцов (показатель положительных результатов: 63,3%; 1020 из 1612). Два или более организмов были обнаружены с помощью теста FilmArray RP2plus среди 24,0% положительных образцов (245 из 1020; 15,2% всех протестированных образцов, 245 из 1612).

Таблица 8. Суммарные ожидаемые значения (множественные обнаружения с числом случаев ≥5 как определено FilmArray RP2plus) Отчет по возрастным группам для проспективной клинической оценки (с января по март и с сентября по ноябрь 2016 г.)

Комбинация множественного обнаружения	Всего (N = 1612)	≤5 лет (N = 885)	6 лет–21 год (N = 331)	22 года–49 лет (N = 128)	50 и более лет (N = 268)
Аденовирус + HRV/EV	30 (1,9%)	27 (3,1%)	3 (0,9%)	0 (0%)	0 (0%)
HRV/EV + RSV	22 (1,4%)	22 (2,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CoV-HKU1 + RSV	13 (0,8%)	12 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,4%)
CoV-NL63 + RSV	13 (0,8%)	12 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,4%)
HRV/EV + PIV2	11 (0,7%)	9 (1,0%)	1 (0,3%)	0 (0%)	1 (0,4%)
HRV/EV + PIV3	11 (0,7%)	10 (1,1%)	1 (0,3%)	0 (0%)	0 (0%)
Аденовирус + RSV	10 (0,6%)	8 (0,9%)	2 (0,6%)	0 (0%)	0 (0%)
Аденовирус + HRV/EV + RSV	9 (0,6%)	9 (1,0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
CoV-NL63 + HRV/EV	8 (0,5%)	7 (0,8%)	1 (0,3%)	0 (0%)	0 (0%)
CoV-HKU1 + HRV/EV	5 (0,3%)	3 (0,3%)	2 (0,6%)	0 (0%)	0 (0%)

Комбинация множественного обнаружения	Всего (N = 1612)	≤5 лет (N = 885)	6 лет–21 год (N = 331)	22 года–49 лет (N = 128)	50 и более лет (N = 268)
CoV-OC43 + HRV/EV	5 (0,3%)	5 (0,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
hMPV + HRV/EV	5 (0,3%)	5 (0,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБНАРУЖЕНИЯ

Клиническая эффективность теста на SARS-CoV-2 панели BioFire RP2.1plus и сравнение с FilmArray RP2plus

Для оценки эффективности новых анализов BioFire RP2.1plus SARS-CoV-2 и для демонстрации эквивалентной эффективности всех других анализов по сравнению с оригинальной панелью FilmArray RP2plus при тестировании клинических образцов было проведено клиническое исследование с тремя группами.

Первая группа включала тестирование 50 естественных ретроспективных (архивных) образцов МНГ, которые были ранее охарактеризованы как положительные на SARS-CoV-2 различными анализами, для которых имеется разрешение на использование в экстренных ситуациях (EUA). Образцы были получены из трех разных по географическому расположению лабораторий в Соединенных Штатах (Таблица 9) и были собраны в марте и апреле 2020 г.

Таблица 9. Архивные исходные образцы и методы идентификации

Центр	Местоположение	Протестированные положительные образцы	Метод идентификации образца
Центр 1	Солт-Лейк-Сити, штат Юта	15	Panther Fusion® SARS-CoV-2 (Hologic, Inc.; EUA)
Центр 2	Сизтл, штат Вашингтон	15	Разработанный лабораторией тест (LDT), основанный на анализах CDC N1 и N2 (EUA штата Вашингтон)
Центр 3	Омаха, штат Небраска	20	cobas® SARS-CoV-2 (Roche Molecular Systems; EUA)

Положительные образцы были рандомизированы и протестированы параллельно с 50 образцами МНГ, которые были собраны до декабря 2019 г.; то есть, для которых ожидается отрицательный результат на SARS-CoV-2. Диагностическая чувствительность это процент совпадения положительных результатов (далее PPA), который был определен путем сравнения наблюдаемого результата теста с ожидаемым результатом теста на основании предыдущего лабораторного тестирования, а диагностическая специфичность это процент совпадения отрицательных результатов (далее NPA), который был определен путем сравнения наблюдаемого результата теста для отрицательных образцов SARS-CoV-2 с ожидаемым результатом Not Detected (Не обнаружен). В ходе испытания два образца (один положительный и один отрицательный) были исключены вследствие ошибок прибора. Результаты по остальным 98 доступным для оценки образцам представлены в (Таблица 10). Для архивных образцов SARS-CoV-2 PPA составлял 98% (48 из 49), а NPA составлял 100%.

Таблица 10. Отчет по эффективности тестирования архивных образцов МНГ SARS-CoV-2 с помощью BioFire RP2.1plus

Совпадение с известным составом аналита						
Сравнительный метод	PPA: TP/(TP+FN)	%	95% ДИ	NPA: TN/(TN+FP)	%	95% ДИ
Panther Fusion® SARS-CoV-2 (Hologic, Inc.)	14 из 15 ¹	93,3	[70,2-98,8%]	Не применимо	Не применимо	Не применимо
Разработанный лабораторией тест (LDT), основанный на анализах CDC N1 и N2	15 из 15	100	[79,6-100%]	Не применимо	Не применимо	Не применимо
cobas® SARS-CoV-2 (Roche Molecular Systems)	20 из 20	100	[83,9-100%]	Не применимо	Не применимо	Не применимо
Отрицательные образцы	Не применимо	Не применимо	Не применимо	49 из 49	100	[92,7-100%]
Общее совпадение	48 из 49 ¹	98	[89,3-99,6%]	49 из 49	100	[92,7-100%]

¹ Один ложноотрицательный образец дал положительный результат при повторном испытании

Примечательно, что из 48 образцов с результатами SARS-CoV-2 Detected (SARS-CoV-2 Обнаружен), в 10,4% (5 из 48) имелись другие аналиты, идентифицированные BioFire RP2.1plus (Таблица 11).

Таблица 11. Дополнительные аналиты, идентифицированные BioFire RP2.1plus в 48 образцах с результатами SARS-CoV-2 Detected (SARS-CoV-2 Обнаружен)

Дополнительные аналиты	Количество наблюдаемых (%)
Аденовирус	1 (2,1%)
HRV/EV	4 (8,3%)

Тестирование архивных клинических образцов было дополнено тестированием 50 искусственных клинических образцов с добавлением инактивированного изолята SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 на различных уровнях LoD (25 на 2× LoD, 15 на 3× LoD и 10 на 5× LoD) и рандомизированных с десятью образцами без добавок. Каждый образец представлял собой уникальный естественный образец МНГ, собранный до декабря 2019 г., и соответственно, ожидалось, что они будут отрицательными на SARS-CoV-2. PPA был определен путем сравнения наблюдаемых результатов теста для образцов, искусственно полученных из уникальных клинических образцов, с ожидаемым результатом Detected (Обнаружен). PPA и NPA показаны в Таблица 12. При тестировании искусственных образцов SARS-CoV-2 как PPA, так и NPA составили 100%.

Таблица 12. Тестирование искусственных образцов SARS-CoV-2 с использованием BioFire RP2.1plus

Совпадение с известным составом аналита				
	PPA: TP/(TP+FN)	%	NPA: TN/(TN+FP)	%
Общее совпадение	50 из 50	100%	10 из 10	100%
95% ДИ	[92,9-100%]		[72,2-100%]	

Последнюю группу представляло собой клиническое сравнительное исследование FilmArray RP2plus и модифицированной панели BioFire RP2.1plus с использованием 220 естественных ретроспективных (архивных) клинических образцов. Архивные образцы были выбраны исключительно на основании содержания аналитов. Уровень аналитов, если был известен, не использовался для выбора образца. Образцы были разделены для параллельного тестирования с каждым тестом. Это сравнение архивных образцов демонстрирует эквивалентную эффективность между FilmArray RP2plus и BioFire RP2.1plus для общих аналитов, в общей сложности представляя 97,6% PPA и 99,8% NPA (Таблица 13).

Таблица 13. Сравнение эффективности модифицированной панели BioFire RP2.1plus с оригинальной панелью FilmArray RP2plus с использованием архивных образцов

Аналит	RP2.1+ RP2+	RP2.1- RP2+	PPA:	RP2.1- RP2-	RP2.1+ RP2-	NPA
Вирусы						
Аденовирус	14	1	93,3%	203	2	99%
Коронавирус 229E	10	1	90,9%	209	0	100%
Коронавирус HKU1	10	0	100%	208	2	99%
Коронавирус NL63	10	0	100%	210	0	100%
Коронавирус OC43	10	0	100%	210	0	100%
Метапневмовирус человека	12	0	100%	208	0	100%
Риновирус/энтеровирус человека	19	3	86,4%	195	3	98,5%
Грипп А	30	0	100%	180	0	100%
Грипп А H1	5	0	100%	215	0	100%
Грипп А H1-2009	12	0	100%	208	0	100%
Грипп А H3	13	0	100%	207	0	100%
Грипп В	10	0	100%	210	0	100%
Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) ^a	10	0	100%	210	0	100%
Вирус парагриппа 1	9	0	100%	211	0	100%
Вирус парагриппа 2	11	0	100%	209	0	100%
Вирус парагриппа 3	10	1	90,9%	208	1	99,5%
Вирус парагриппа 4	11	0	100%	209	0	100%
Респираторно-синцитиальный вирус	10	0	100%	210	0	100%
Бактерии						
<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)	10	0	100%	210	0	100%
<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)	10	0	100%	210	0	100%
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	10	0	100%	210	0	100%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	10	0	100%	210	0	100%
Всего	246	6	97,6%	4350	8	99,8%

^a MERS-CoV оценивался в искусственных образцах с использованием инактивированного вируса.

Все 220 образцов, протестированных в клиническом сравнительном исследовании, были собраны до декабря 2019 г. и оценивались на специфичность в отношении SARS-CoV-2. Эти данные обобщены в Таблица 13 вместе со значениями специфичности из других исследований. Общий NPA (специфичность) для всех трех исследований в индивидуальных естественных клинических образцах составил 279 из 279 (100%; Таблица 14).

Таблица 14. Общий NPA (специфичность) BioFire RP2.1plus для SARS-CoV-2

	NPA: TN/(TN+FP)	%	95% ДИ
Архивные образцы	49 из 49	100%	[92,7-100%]
Искусственные образцы	10 из 10	100%	[72,2-100%]
Сравнительные образцы	220 из 220	100%	[98,3-100%]
Всего	279 из 279	100%	[98,6-100%]

Клиническая эффективность FilmArray RP2plus (тесты, сохраненные в BioFire RP2.1plus)

Проспективная клиническая оценка FilmArray RP2plus

Клиническая производительность оригинального теста FilmArray RP2plus была установлена в ходе многоцентрового исследования, проведенного в трех территориально рассредоточенных исследовательских центрах США во время периодов сезонов респираторных заболеваний в 2015–2016 гг. и 2016–2017 гг. Всего для проспективного клинического исследования было получено 1635 остаточных образцов МНГ в вирусной транспортной среде (VTM). В период с января по март 2016 г. образцы были проспективно собраны у всех участников, удовлетворяющих критериям исследования, и немедленно заморожены (число образцов: N = 695) для дальнейшего тестирования в качестве проспективных архивных/замороженных образцов (категория II). В период с сентября по ноябрь 2016 г. образцы были проспективно собраны у всех участников, удовлетворяющих критериям исследования, и протестированы в свежем виде (число образцов: N = 940) в качестве проспективных свежих образцов (категория I). Образцы категории II были распределены по исследовательским центрам, начиная с сентября 2016 г. В это же время центры также начали тестирование образцов категории I. В каждом центре образцы категории II размораживались и тестировались в соответствии с предусмотренными исследованием процедурами, насколько позволяло время на протяжении оставшегося периода клинического исследования. Всего из окончательного анализа эффективности были исключены 23 проспективных образца (образцы категории I и II) из-за несоответствия протоколу исследования. Наиболее распространенные причины исключения образцов: допустимый внешний контроль не был завершен на день тестирования; образцы тестировались на протяжении времени, выходящего за 3-дневный период хранения в замороженном виде; после регистрации обнаруживалось несоответствие образцов критериям включения. Окончательный набор данных состоял из 1612 проспективных образцов. В Таблица 15 приведен отчет по демографическим данным для 1612 образцов, включенных в проспективное исследование.

Таблица 15. Отчет по демографическим данным для проспективной клинической оценки FilmArray RP2plus

		Всего	Центр 1	Центр 2	Центр 3
Пол	Мужской	867 (54%)	331 (57%)	271 (51%)	265 (53%)
	Женский	745 (46%)	250 (43%)	256 (49%)	239 (47%)
Возраст	≤5 лет	885 (55%)	379 (65%)	170 (32%)	336 (67%)
	6 лет–21 год	331 (21%)	132 (23%)	89 (17%)	110 (22%)
	22 года–49 лет	128 (8%)	27 (5%)	79 (15%)	22 (4%)
	50 и более лет	268 (17%)	43 (7%)	189 (36%)	36 (7%)
Статус	Амбулаторные	329 (20%)	77 (13%)	66 (13%)	186 (37%)
	Госпитализированные	640 (40%)	229 (39%)	197 (37%)	214 (42%)
	Требующие скорой помощи	643 (40%)	275 (47%)	264 (50%)	104 (21%)
Всего		1612	581	527	504

Эффективность FilmArray RP2plus оценивалась путем сопоставления результатов теста FilmArray RP2plus с результатами, полученными от одобренной FDA мультиплексной панели респираторных патогенов (основной сравнительный метод), а также с результатами двух аналитически валидированных ПЦР-анализов, с последующим двунаправленным секвенированием на *B. parapertussis* (данный анализ не обнаруживается одобренной FDA мультиплексной панелью респираторных патогенов). Сравнительные анализы на *B. parapertussis* были построены так, чтобы амплифицировать другую последовательность, а не ту, которая была амплифицирована при помощи анализа BioFire RP2. Положительным считался любой образец, данные двунаправленного секвенирования

которого отвечали заранее заданным критериям приемлемости качества, которые соответствовали специфическим для микроорганизма последовательностям, депонированным в базе данных NCBI GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) с приемлемыми E-значениями. Любой образец, для которого были получены отрицательные результаты обоих сравнительных анализов, считался отрицательным.

Диагностическая чувствительность это процент совпадения положительных результатов (далее PPA), который для каждого аналита рассчитывался как $100\% \times (TP / (TP + FN))$. Истинно положительный (TP) указывает на то, что и FilmArray RP2plus, и сравнительный метод дали положительный результат для конкретного анализируемого вещества, а ложноотрицательный результат (FN) указывает на то, что результат FilmArray RP2plus был отрицательным, в то время как результат сравнительного метода был положительным. Диагностическая специфичность это процент совпадения отрицательных результатов (далее NPA), который рассчитывался как $100\% \times (TN / (TN + FP))$. Истинно отрицательный (TN) указывает на то, что и FilmArray RP2plus, и сравнительный метод дали отрицательный результат, а ложноположительный результат (FP) указывает на то, что результат FilmArray RP2plus был положительным, в то время как результат сравнительного метода был отрицательным. Был рассчитан точный биномиальный двусторонний доверительный интервал 95%. Образцы, для которых были получены ложноположительные и/или ложноотрицательные результаты (т.е. несогласующиеся результаты) при сравнении результатов FilmArray RP2plus с результатами сравнительного метода, были подвергнуты дальнейшему исследованию. Исследование несоответствия в основном проводилось путем проведения независимых молекулярных методов с праймерами, отличными от FilmArray RP2plus и/или путем повторного тестирования сравнительным методом. Результаты проспективного клинического исследования обобщены в Таблица 16.

Таблица 16. Отчет о проспективной клинической производительности FilmArray RP2plus

Аналит		Процент совпадения положительных результатов			Процент совпадения отрицательных результатов		
		TP/(TP + FN)	%	95% ДИ	TN/(TN + FP)	%	95% ДИ
Вирусы							
Аденовирус ^a	Свежие	36 из 38	94,7	82,7–98,5	850 из 880	96,6	95,2–97,6
	Замороженные	34 из 36	94,4	81,9–98,5	640 из 658	97,3	95,7–98,3
	Всего	70 из 74	94,6	86,9–97,9	1490 из 1538	96,9	95,9–97,6
CoV-229E ^b	Свежие	5 из 5	100	56,6–100	909 из 913	99,6	98,9–99,8
	Замороженные	6 из 7	85,7	48,7–97,4	686 из 687	99,9	99,2–100
	Всего	11 из 12	91,7	64,6–98,5	1595 из 1600	99,7	99,3–99,9
CoV-HKU1 ^b	Свежие	1 из 1	100	–	917 из 917	100	99,6–100
	Замороженные	42 из 42	100	91,6–100	640 из 652	98,2	96,8–98,9
	Всего	43 из 43	100	91,8–100	1557 из 1569	99,2	98,7–99,6
CoV-NL63 ^c	Свежие	0 из 0	–	–	917 из 918	99,9	99,4–100
	Замороженные	40 из 40	100	91,2–100	645 из 654	98,6	97,4–99,3
	Всего	40 из 40	100	91,2–100	1562 из 1572	99,4	98,8–99,7
CoV-OC43 ^a	Свежие	11 из 13	84,6	57,8–95,7	904 из 905	99,9	99,4–100
	Замороженные	22 из 28	78,6	60,5–89,8	662 из 666	99,4	98,5–99,8
	Всего	33 из 41	80,5	66,0–89,8	1566 из 1571	99,7	99,3–99,9
hMPV ^e	Свежие	5 из 5	100	56,6–100	913 из 913	100	99,6–100
	Замороженные	68 из 70	97,1	90,2–99,2	616 из 624	98,7	97,5–99,3
	Всего	73 из 75	97,3	90,8–99,3	1529 из 1537	99,5	99,0–99,7
HRV/EV ^a	Свежие	320 из 328	97,6	95,3–98,8	532 из 590	90,2	87,5–92,3
	Замороженные	105 из 108	97,2	92,1–99,1	567 из 586	96,8	95,0–97,9
	Всего	425 из 436	97,5	95,5–98,6	1099 из 1176	93,5	91,9–94,7

Аналит		Процент совпадения положительных результатов			Процент совпадения отрицательных результатов		
		TP/(TP + FN)	%	95% ДИ	TN/(TN + FP)	%	95% ДИ
FluA ^a	Свежие	3 из 3	100	43,9–100	915 из 915	100	99,6–100
	Замороженные	75 из 75	100	95,1–100	616 из 616	100	99,4–100
	Всего	78 из 78	100	95,3–100	1531 из 1531	100	99,7–100
FluA H1	Свежие	0 из 0	–	–	918 из 918	100	99,6–100
	Замороженные	0 из 0	–	–	691 из 691	100	99,4–100
	Всего	0 из 0	–	–	1609 из 1609	100	99,8–100
FluA H1-2009	Свежие	0 из 0	–	–	918 из 918	100	99,6–100
	Замороженные	74 из 74	100	95,1–100	617 из 617	100	99,4–100
	Всего	74 из 74	100	95,1–100	1535 из 1535	100	99,8–100
FluA H3	Свежие	3 из 3	100	43,9–100	915 из 915	100	99,6–100
	Замороженные	1 из 1	100	–	690 из 690	100	99,4–100
	Всего	4 из 4	100	51,0–100	1605 из 1605	100	99,8–100
FluB ^a	Свежие	0 из 0	–	–	918 из 918	100	99,6–100
	Замороженные	14 из 14	100	78,5–100	678 из 680	99,7	98,9–99,9
	Всего	14 из 14	100	78,5–100	1596 из 1598	99,9	99,5–100
MERS-CoV	Свежие	0 из 0	–	–	918 из 918	100	99,6–100
	Замороженные	0 из 0	–	–	691 из 691	100	99,4–100
	Всего	0 из 0	–	–	1609 из 1609	100	99,8–100
PIV1 ^k	Свежие	5 из 5	100	56,6–100	913 из 913	100	99,6–100
	Замороженные	4 из 4	100	51,0–100	689 из 690	99,9	99,2–100
	Всего	9 из 9	100	70,1–100	1602 из 1603	99,9	99,6–100
PIV2 ⁿ	Свежие	46 из 47	97,9	88,9–99,6	863 из 871	99,1	98,2–99,5
	Замороженные	0 из 0	–	–	694 из 694	100	99,4–100
	Всего	46 из 47	97,9	88,9–99,6	1557 из 1565	99,5	99,0–99,7
PIV3 ^m	Свежие	40 из 42	95,2	84,2–98,7	867 из 876	99,0	98,1–99,5
	Замороженные	3 из 3	100	43,9–100	690 из 691	99,9	99,2–100
	Всего	43 из 45	95,6	85,2–98,8	1557 из 1567	99,4	98,8–99,7
PIV4 ^h	Свежие	6 из 6	100	61,0–100	910 из 912	99,8	99,2–99,9
	Замороженные	3 из 3	100	43,9–100	686 из 691	99,3	98,3–99,7
	Всего	9 из 9	100	70,1–100	1596 из 1603	99,6	99,1–99,8
RSV ^o	Свежие	44 из 45	97,8	88,4–99,6	867 из 873	99,3	98,5–99,7
	Замороженные	131 из 131	100	97,2–100	545 из 563	96,8	95,0–98,0
	Всего	175 из 176	99,4	96,9–99,9	1412 из 1436	98,3	97,5–98,9
Бактерии							
<i>B. parapertussis</i> (IS1001) ⁿ	Свежие	4 из 5	80,0	37,6–96,4	913 из 913	100	99,6–100
	Замороженные	2 из 2	100	34,2–100	692 из 692	100	99,4–100
	Всего	6 из 7	85,7	48,7–97,4	1605 из 1605	100	99,8–100
<i>B. pertussis</i> (ptxP) ^p	Свежие	2 из 2	100	34,2–100	915 из 916	99,9	99,4–100
	Замороженные	0 из 1	0,0	–	693 из 693	100	99,4–100
	Всего	2 из 3	66,7	20,8–93,9	1608 из 1609	99,9	99,6–100

Аналит		Процент совпадения положительных результатов			Процент совпадения отрицательных результатов		
		TP/(TP + FN)	%	95% ДИ	TN/(TN + FP)	%	95% ДИ
<i>C. pneumoniae</i> ⁶	Свежие	2 из 2	100	34,2–100	915 из 916	99,9	99,4–100
	Замороженные	3 из 3	100	43,9–100	691 из 691	100	99,4–100
	Всего	5 из 5	100	56,6–100	1606 из 1607	99,9	99,6–100
<i>M. pneumoniae</i> ⁷	Свежие	17 из 17	100	81,6–100	897 из 901	99,6	98,9–99,8
	Замороженные	6 из 7	85,7	48,7–97,4	686 из 687	99,9	99,2–100
	Всего	23 из 24	95,8	79,8–99,3	1583 из 1588	99,7	99,3–99,9

⁶ Аденовирус был обнаружен в 3 из 4 ложноотрицательных образцов с помощью независимого молекулярного метода. Аденовирус был обнаружен в 38 из 48 ложноположительных образцов с помощью независимого молекулярного метода; было показано, что два дополнительных ложноположительных образца были собраны у пациентов с историей острой аденовирусной инфекции.

⁶ При тестировании с использованием независимого молекулярного метода один ложноотрицательный образец имел отрицательный результат на CoV-229E. При тестировании с использованием независимого молекулярного метода все пять ложноположительных образцов имели отрицательный результат на CoV-229E.

⁶ Вирус CoV-HKU1 был обнаружен в 3 из 12 ложноположительных образцов в результате повторного тестирования сравнительным методом.

⁷ Вирус CoV-NL63 был обнаружен в 3 из 10 ложноположительных образцов в ходе исследования несоответствия; два случая были обнаружены с помощью независимого молекулярного метода, и один случай был обнаружен с помощью повторного тестирования сравнительным методом.

⁸ Из восьми ложноотрицательных образцов шесть дали истинно положительный результат на CoV-HKU1. Подтверждено, что такие результаты были получены в результате известной перекрестной реактивности с вирусом CoV-HKU1 в сравнительном методе; все шесть образцов имели отрицательный результат на CoV-OC43 при тестировании с помощью двух независимых ПЦР-анализов; два оставшихся ложноотрицательных образца дали отрицательный результат на CoV-OC43 при тестировании независимым молекулярным методом. Вирус CoV-OC43 был обнаружен в 2 из 5 ложноположительных образцов в результате повторного тестирования сравнительным методом.

⁹ Оба ложноотрицательных образца дали отрицательный результат на hMPV при тестировании независимым молекулярным методом. Вирус hMPV был обнаружен в 6 из 8 ложноположительных образцов в ходе исследования несоответствия; один случай был обнаружен независимым молекулярным методом и пять были обнаружены при повторном тестировании сравнительным методом.

¹⁰ Вирус HRV/EV был обнаружен в 5 из 11 ложноотрицательных образцов в ходе исследования несоответствия; один случай был обнаружен с помощью дополнительного молекулярного метода и четыре случая были обнаружены при повторном тестировании с помощью FilmArray RP2plus. Вирус HRV/EV был обнаружен в 33 из 77 ложноположительных образцов в ходе исследования несоответствия; четыре случая были обнаружены с помощью независимого молекулярного метода, а 29 случаев были обнаружены с помощью повторного тестирования сравнительным методом.

¹¹ Три образца были исключены из анализа вируса гриппа А: один образец — с помощью сравнительного метода с результатом Influenza A (No Subtype Detected) (Грипп А (подтипы не обнаружены)) и два образца были обнаружены FilmArray RP2plus с результатом Influenza A (Equivocal) (Грипп А (сомнительный)).

¹² Вирус FluB был обнаружен в обоих ложноположительных образцах в ходе исследования несоответствия; один случай был обнаружен с помощью независимого молекулярного метода, и один случай был обнаружен с помощью повторного тестирования сравнительным методом.

¹³ При тестировании с использованием независимого молекулярного метода один ложноположительный образец имел отрицательный результат на PIV1.

¹⁴ При тестировании с использованием независимого молекулярного метода один ложноотрицательный образец имел отрицательный результат на PIV2. Вирус PIV2 был обнаружен в 5 из 8 ложноположительных образцов в ходе исследования несоответствия; один случай был обнаружен с помощью независимого молекулярного метода, а четыре случая были обнаружены с помощью повторного тестирования сравнительным методом.

¹⁵ Вирус PIV3 был обнаружен в обоих ложноотрицательных образцах в ходе исследования несоответствия; один случай был обнаружен с помощью дополнительного молекулярного метода, а один случай был обнаружен при повторном тестировании с помощью FilmArray RP2plus. Вирус PIV3 был обнаружен в 4 из 10 ложноположительных образцов в ходе исследования несоответствия; два случая были обнаружены с помощью независимого молекулярного метода, а два случая были обнаружены с помощью повторного тестирования сравнительным методом.

¹⁶ Вирус PIV4 был обнаружен в 1 из 7 ложноположительных образцов с помощью независимого молекулярного метода.

¹⁷ При тестировании с использованием независимого молекулярного метода один ложноотрицательный образец имел отрицательный результат на RSV. Вирус RSV был обнаружен в 8 из 24 ложноположительных образцов в ходе исследования несоответствия; три случая были обнаружены с помощью независимого молекулярного метода, а пять случаев были обнаружены с помощью повторного тестирования сравнительным методом.

¹⁸ Бактерия *B. paraptussis* была обнаружена в одном ложноотрицательном образце при повторном тестировании с помощью FilmArray RP2plus.

¹⁹ Бактерия *B. pertussis* была обнаружена как в ложноотрицательном, так и в ложноположительном образце с помощью независимого молекулярного метода.

²⁰ Бактерия *C. pneumoniae* была обнаружена в одном ложноположительном образце с помощью независимого молекулярного метода.

²¹ Бактерия *M. pneumoniae* была обнаружена в одном ложноотрицательном образце при повторном тестировании с помощью FilmArray RP2plus. Бактерия *M. pneumoniae* была обнаружена во всех пяти ложноположительных образцах в ходе исследования несоответствия; три случая были обнаружены с помощью независимого молекулярного метода, а два случая были обнаружены с помощью повторного тестирования сравнительным методом.

При использовании панели FilmArray RP2plus было зафиксировано 245 образцов с несколькими различными микроорганизмами (15,2% всех образцов, 245 из 1612; и 24,0% положительных образцов, 245 из 1020; Таблица 17). Большинство из множественных обнаружений (190 из 245, 77,6%) содержали два микроорганизма, в то время как 20,0% (49 из 245) содержали три микроорганизма, 1,6% (4 из 245) содержали четыре микроорганизма, 0,4% (1 из 245) содержали пять микроорганизмов и 0,4% (1 из 245) содержали шесть микроорганизмов. Из 245 образцов с множественными обнаружениями 124 образца (50,6%; 124 из 245) были сходны со сравнительными методами. Сто

двадцать один (121) образец (49,4%; 121 из 245) содержал один или более микроорганизмов, не обнаруженных сравнительными методами (ложноположительные результаты).

Три микроорганизма, наиболее распространенные в множественных обнаружениях, также являлись тремя наиболее распространенными микроорганизмами в исследовании в целом (т. е. HRV/EV, RSV и аденовирус). Наиболее распространенные множественные обнаружения (≥ 5 случаев) показаны в Таблица 18.

Таблица 17. Распространенность аналитов в множественных обнаружениях, как определено FilmArray RP2plus

Аналит	Распространенность в множественных обнаружениях (N = 245)	
Вирусы		
Аденовирус	85	34,7%
CoV-229E	6	2,4%
CoV-HKU1	41	16,7%
CoV-NL63	31	12,7%
CoV-OC43	19	7,8%
hMPV	33	13,5%
HRV/EV	150	61,2%
FluA H1	0	0%
FluA H1-2009	9	3,7%
FluA H3	2	0,8%
FluB	6	2,4%
MERS-CoV	0	0%
PIV1	5	2,0%
PIV2	15	6,1%
PIV3	21	8,6%
PIV4	12	4,9%
RSV	105	42,9%
Бактерии		
<i>B. paraptussis</i> (IS1001)	6	2,4%
<i>B. pertussis</i> (ptxP)	0	0%
<i>C. pneumoniae</i>	1	0,4%
<i>M. pneumoniae</i>	7	2,9%

Наиболее распространенным стало множественное обнаружение аденовируса с HRV/EV (1,9% всех образцов, 30 из 1612), на втором месте оказался HRV/EV с RSV (1,4% всех образцов; 22 из 1612). Как указывалось ранее, они также были наиболее распространенными микроорганизмами, обнаруженными в результате исследования.

Таблица 18. Комбинации при множественных обнаружениях (≥ 5 случаев), как определено FilmArray RP2plus

Различные комбинации при множественных обнаружениях			Всего множественных обнаружений	Число образцов с ложноположительными результатами обнаружения	Аналиты с ложноположительными результатами ³
Аналит 1	Аналит 2	Аналит 3			
Аденовирус	HRV/EV		30	15	Аденовирус (15), HRV/EV (1)
HRV/EV	RSV		22	7	HRV/EV (3), RSV (4)
CoV-HKU1	RSV		13	7	CoV-HKU1 (4), RSV (3)

Различные комбинации при множественных обнаружениях			Всего множественных обнаружений	Число образцов с ложноположительными результатами обнаружения	Аналиты с ложноположительными результатами ^a
Аналит 1	Аналит 2	Аналит 3			
CoV-NL63	RSV		13	3	CoV-NL63 (2), RSV (1)
HRV/EV	PIV2		11	7	HRV/EV (6), PIV2 (2)
HRV/EV	PIV3		11	6	HRV/EV (3), PIV3 (4)
Аденовирус	RSV		10	5	Аденовирус (4), RSV (1)
Аденовирус	HRV/EV	RSV	9	5	Аденовирус (2), HRV/EV (3), RSV (1)
CoV-NL63	HRV/EV		8	2	CoV-NL63 (2)
CoV-HKU1	HRV/EV		5	2	CoV-HKU1 (1), HRV/EV (1)
CoV-OC43	HRV/EV		5	3	HRV/EV (3)
hMPV	HRV/EV		5	1	HRV/EV

^a Из 67 несогласующихся аналитов (из общего числа в 293 аналита), 32 аналита (47,8%) было обнаружено в образце во время исследования несоответствия; 22 из 67 аналитов (32,8%) были обнаружены с помощью независимого молекулярного метода, и 13 из 67 (19,4%) были обнаружены во время повторного сравнительного теста.

Общий показатель успеха для начальных тестов образцов в проспективном исследовании составил 99,3% (1611/1623) (95% ДИ: 98,7–99,6%); 12 тестов были неудачными (один из-за незавершенного теста, один из-за ошибки прибора и десять из-за ошибок контролей). Два начальных теста (2 из 1623; 0,1%) не были завершены, поэтому успешность инструмента при выполнении начальных тестов образцов составила 99,9% (1621 из 1623) (95% ДИ: 99,6–100%). Удалось выполнить повторное тестирование обоих образцов, поэтому действительные результаты были получены после одного повторного тестирования. Для десяти тестов (10 из 1621; 0,6%) не были получены достоверные контроли кассет, в результате чего успешность контроля кассет составила 99,4% (1611 из 1621) (95% ДИ: 98,9–99,7%) для завершенных тестов исходных образцов. Девять из 10 недействительных образцов удалось протестировать повторно и получить достоверные результаты контроля после одного повторного теста; один образец не удалось протестировать повторно ввиду недостаточного объема.

Тестирование заранее отобранных архивных образцов с оригинальной панелью FilmArray RP2plus

Некоторые аналиты FilmArray RP2plus имели низкий уровень распространенности и не встречались в достаточно большом объеме в ходе проспективного исследования для надлежащей демонстрации производительности системы. Чтобы дополнить результаты проспективного клинического исследования, в лаборатории BioFire была проведена оценка предварительно отобранных архивных ретроспективных образцов. Эти образцы являлись архивными МНГ в VTM и были выбраны, поскольку ранее они давали положительные результаты при тестировании на следующие аналиты: коронавирус 229E, грипп А Н1, грипп А Н3, грипп В, вирус парагриппа 1, вирус парагриппа 4, *Bordetella parapertussis*, *B. pertussis* и *Chlamydia pneumoniae*. Ожидалось также, что вирус парагриппа 2, вирус парагриппа 3 и *Mycoplasma pneumoniae* будут иметь низкую распространенность на основании данных BioFire, собранных в течение сезона респираторных заболеваний 2015–2016 гг. Поэтому для них также было проведено архивное тестирование, и результаты были включены в данные исследования (несмотря на то, что в конечном счете эти аналиты наблюдались в большем количестве в ходе проспективного клинического исследования).

ПРИМЕЧАНИЕ. Результаты тестирования архивных образцов MERS-CoV представлены отдельно. Результаты тестирования архивных образцов MERS-CoV см. в Таблице 22.

Изначально для тестирования в ходе данного проспективного исследования были получены 217 предварительно отобранных архивных ретроспективных клинических образцов. До тестирования с помощью FilmArray RP2plus состав/целостность образцов были подтверждены с помощью подтверждающих молекулярных методов (ПЦР с

последующим двунаправленным секвенированием для *B. paraptussis* или одобренная FDA мультиплексная панель респираторных патогенов).

Образцы разделили на две группы тестирования на основе выполненного метода подтверждающего тестирования: все образцы, содержащие аналиты в сравнительном методе с использованием одобренной FDA мультиплексной панели респираторных патогенов, были протестированы в группе 1, а образцы, содержащие *B. paraptussis*, были протестированы в группе 2. Отрицательные МНГ-образцы также включили в каждую группу для тестирования.

Сравнительный метод с использованием одобренной FDA мультиплексной панели респираторных патогенов был проведен только на 197 из 217 предварительно отобранных архивных ретроспективных образцах (группа 1). Один из 197 образцов был исключен из анализа производительности ввиду неправильного тестирования с помощью FilmArray RP2plus с недостаточным объемом для проведения повторного тестирования. Кроме того, два из 197 образцов также были исключены из анализа производительности, поскольку ввиду отсутствия достоверного подтверждающего результата в результате проведения сравнительного метода с использованием одобренной FDA мультиплексной панели респираторных патогенов, а объема образцов не хватило для повторного тестирования: один сравнительный тест не был завершен, а другой сравнительный тест завершился ошибкой контроля. Достоверные результаты сравнительного метода и использования FilmArray RP2plus были получены для 194 из этих 197 архивных образцов (группа 1).

ПЦР на *B. paraptussis* с последующими сравнительными анализами с использованием двунаправленного секвенирования были выполнены только на 20 из 217 предварительно отобранных архивных ретроспективных клинических образцов (группа 2). Сравнительный метод с использованием одобренной FDA мультиплексной панели респираторных патогенов не проводился для образцов группы 2. Достоверные результаты сравнительного метода и использования FilmArray RP2plus были получены для 20 из этих 20 архивных образцов.

Отчет об имеющейся демографической информации по этим 214 достоверным архивным образцам приведен в Таблица 19.

Таблица 19. Доступная сводная демографическая информация для всех достоверных архивных образцов

Всего образцов		214
Пол	Женщины (%)	75 (35%)
	Мужчины (%)	81 (38%)
	Неизвестно	58 (27%)
Возрастной диапазон	≤5 лет	78 (36%)
	6 лет–21 год	46 (21%)
	22 года–49 лет	13 (6%)
	50 и более лет	19 (9%)
	Неизвестно	58 (27%)

Все положительные архивные образцы группы 1 и группы 2 (установленные исходной лабораторией), которые не были подтверждены соответствующим сравнительным методом, были в дальнейшем исключены из вычисления производительности тестирования каждого из соответствующих аналитов.

Эффективность тестирования ретроспективных образцов с помощью FilmArray RP2plus в сопоставлении со сравнительными методами приведены в Таблица 20 по каждому аналиту.

Таблица 20. Отчет по эффективности тестирования архивных образцов с помощью FilmArray RP2plus

Аналит	Процент совпадения положительных результатов			Процент совпадения отрицательных результатов		
	TP/(TP + FN)	%	95% ДИ	TN/(TN + FP)	%	95% ДИ
Вирусы						
Аденовирус	0 из 0	0	Не применимо	189 из 194	97,4	94,1–98,9
CoV- 229E ^a	15 из 15	100	79,6–100	175 из 175	100	97,9–100
CoV-HKU1	0 из 0	0	Не применимо	194 из 194	100	98,1–100
CoV-NL63	2 из 2	100	34,2–100	192 из 192	100	98,0–100
CoV-OC43	0 из 0	0	Не применимо	194 из 194	100	98,1–100
hMPV	1 из 1	100	20,7–100	192 из 193	99,5	97,1–99,9
HRV/EV	18 из 19	94,7	75,4–99,1	168 из 175	96,0	92,0–98,0
Грипп А	22 из 22	100	85,1–100	172 из 172	100	97,8–100
Грипп А Н1	3 из 3	100	43,9–100	191 из 191	100	98,0–100
Грипп А 2009-Н1	1 из 1	100	20,7–100	193 из 193	100	98,0–100
Грипп А Н3	18 из 18	100	82,4–100	176 из 176	100	97,9–100
Грипп В ^b	16 из 16	100	80,6–100	177 из 177	100	97,9–100
Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV)	0 из 0	0	Не применимо	177 из 177	100	97,9–100
Вирус парагриппа 1	16 из 16	100	80,6–100	178 из 178	100	97,9–100
Вирус парагриппа 2 ^c	16 из 16	100	80,6–100	177 из 177	100	97,9–100
Вирус парагриппа 3	17 из 17	100	81,6–100	175 из 177	98,9	96,0–99,7
Вирус парагриппа 4	17 из 17	100	81,6–100	174 из 177	98,3	95,1–99,4
RSV	2 из 2	100	34,2–100	191 из 192	99,5	97,1–99,9
Бактерии						
<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001) ^d	16 из 16	100	80,6–100	4 из 4	100	51,0–100
<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP) ^e	25 из 26	96,2	81,1–99,3	160 из 162	98,8	95,6–99,7
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ^f	17 из 17	100	81,6–100	176 из 176	100	97,9–100
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ^g	16 из 16	100	80,6–100	171 из 173	98,8	95,9–99,7

^a Четыре из 19 архивных образцов с положительным результатом на CoV-229E от исходной лаборатории не были подтверждены сравнительным методом, поэтому были исключены из вычисления эффективности тестирования на CoV-229E.

^b Один из 17 архивных образцов с положительным результатом на вирус гриппа В от исходной лаборатории не был подтвержден сравнительным методом, поэтому был исключен из вычисления эффективности тестирования на вирус гриппа В.

^c Один из 17 архивных образцов с положительным результатом на вирус парагриппа 2 от исходной лаборатории не был подтвержден сравнительным методом, поэтому был исключен из вычисления эффективности тестирования на вирус парагриппа 2.

^d Сравнительное тестирование с помощью ПЦР на *B. parapertussis* с последующими анализами секвенирования было выполнено только на 20 архивных образцах (группа 2). Тестирование сравнительным методом для других аналитов не выполнялось на этих 20 образцах.

^e Шесть из 31 архивного образца с положительным результатом на *B. pertussis* от исходной лаборатории не были подтверждены сравнительным методом, поэтому были исключены из вычисления эффективности тестирования на *B. pertussis*.

^f Один из 17 архивных образцов с положительным результатом на *C. pneumoniae* от исходной лаборатории не был подтвержден сравнительным методом, поэтому был исключен из вычисления эффективности тестирования на *C. pneumoniae*.

^g Пять из 21 архивного образца с положительным результатом на *M. pneumoniae* от исходной лаборатории не были подтверждены сравнительным методом, поэтому были исключены из вычисления эффективности тестирования *M. pneumoniae*.

Архивные образцы МНГ из трех подтвержденных случаев инфекции MERS-CoV были оценены с помощью FilmArray RP2plus. Изначально образцы были идентифицированы с положительным результатом на MERS-CoV в двух анализах RT-ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией для *npE* и *ORF1A*, которые были получены во время вспышки MERS-CoV в Южной Корее в 2015 г. Процент совпадения положительных результатов (PPA) теста FilmArray RP2plus с результатами предыдущего теста составил 100%.

Таблица 21. Отчет об эффективности FilmArray RP2plus при тестировании архивных образцов на MERS-CoV

Аналит	PPA:		
	TP/(TP + FN)	%	95% ДИ
MERS-CoV	3 из 3	100	43,8–100

Тестирование искусственных образцов с оригинальной панелью FilmArray RP2plus

Вирус гриппа A H1 и MERS-CoV встречаются настолько редко, что тестирования проспективных и архивных экземпляров оказалось недостаточно, чтобы продемонстрировать эффективность системы. В качестве дополнения к проспективным и ретроспективным данным была проведена оценка искусственных образцов. Искусственные клинические образцы были подготовлены с использованием остаточных образцов МНГ, которые дали отрицательный результат при тестировании их ранее с помощью одобренной FDA мультиплексной панели респираторных патогенов (т.е. тестирование, аналогичное сравнительному методу, примененному в проспективных и ретроспективных клинических оценках) в исходной лаборатории. В образцы были добавлены вирус гриппа A H1 и инактивированный вирус MERS-CoV в клинически значимых уровнях (в пределах от 2х до 1000х LoD и от 0,2х до 1000х LoD соответственно), а затем эти образцы были рандомизированы с отрицательными образцами (без добавок) таким образом, что статус аналита каждого искусственного образца был неизвестен специалистам, которые проводили тестирование. Результаты тестирования искусственных образцов с помощью FilmArray RP2plus представлены в Таблица 22.

Таблица 22. Эффективность FilmArray RP2plus с использованием искусственных образцов

Аналит	Чувствительность/PPA			Специфичность/NPA		
	TP/(TP + FN)	%	95% ДИ	TN/(TN + FP)	%	95% ДИ
Грипп A H1	47 из 48 ^a	97,9	89,1–99,6	50 из 50	100	92,9–100
MERS-CoV ^b	50 из 50	100	92,9–100	50 из 50	100	92,9–100

^a В ложноотрицательный образец был добавлен вирус гриппа A/Weiss/43; этот штамм был обнаружен во всех остальных концентрациях. Для двух образцов (в которые был также добавлен штамм A/Weiss/43) был получен результат Грипп A: Equivocal (Сомнительный) или Грипп A H1: Equivocal (Сомнительный), поэтому они были исключены из вычисления эффективности тестирования на вирус гриппа A H1.

^b BEI Resources, NIAID, NIH: коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), EMC/2012, инактивированный нагреванием, NR-50171.

Предел обнаружения

Предел обнаружения (LoD) для аналитов BioFire RP2.1plus был оценен с помощью тестирования последовательных разведений известных концентраций микроорганизмов в объединенных клинических образцах МНГ или транспортной среде. Расчетные концентрации LoD были подтверждены тестированием 20 повторностей на системах FilmArray 2.0 и FilmArray Torch, и требовалось обнаружение аналита BioFire RP2.1plus в по меньшей мере 19 из 20 повторностей (≥95%). Подтвержденные концентрации LoD BioFire RP2.1plus перечислены в Таблица 23 в копиях нуклеиновой кислоты на мл и/или жизнеспособных или инфекционных единицах (например, КОЕ/мл или ТЦД₅₀/мл). Концентрации в копиях нуклеиновой кислоты на мл были определены количественной ПЦР в реальном времени или цифровой капельной ПЦР.

Таблица 23. Предел обнаружения (LoD) для аналитов BioFire RP2.1plus

Аналит	Изолят	Концентрация LoD	Количество обнаруженных/всего (%)
Вирусы			
Аденовирус	Вид С, серотип 2 Международный стандарт ВОЗ NIBSC 16/324	3,0E+03 МЕ/мл ^a (3,0E+03 копий/мл) ^b	20 из 20 100%
Коронавирус 229E	ATCC VR-740	6,5E+01 копий/мл (4,0E-01 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Коронавирус HKU1	Клинический образец	2,0E+03 копий РНК/мл	19 из 20 95,0%

Аналит	Изолят		Концентрация LoD	Количество обнаруженных/всего (%)
Коронавирус NL63	BEI NR-470		5,4E+01 копий/мл (2,5E-01 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Коронавирус OC43	ATCC VR-759		5,6E+02 копий/мл (3,0E+01 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV)	EMC/2012 BEI NR-50171 (инактивированный нагреванием)		1,3E+02 копий/мл 2,0E+00 ТЦД ₅₀ /мл	20 из 20 100%
Коронавирус синдрома атипичной пневмонии 2 (SARS-CoV-2)	USA-WA1/2020	Инактивированный нагреванием вирус ATCC VR-1986HK	5,0E+02 копий/мл ^a (6,9E-02 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
		Патогенный вирус ^c	1,6E+02 копий/мл ^f (1,1E-02 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Метапневмовирус человека	16, тип A1 IA10-2003 Zeptomatrix 0810161CF		1,0E+01 ТЦД ₅₀ /мл ^a	20 из 20 100%
Риновирус/энтеровирус человека	Риновирус человека Тип 1A Zeptomatrix 0810012CFN		3,8E+01 копий/мл	19 из 20 95,0%
	Энтеровирус D68 ATCC VR-1823		2,6E+01 копий/мл (3,0E+02 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Грипп А Н1	Грипп А H1N1 A/Новая Каледония/20/99 Zeptomatrix 0810036CF		1,4E+02 копий/мл (1,0E+03 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Грипп А Н1-2009	Грипп А H1N1pdm09 A/Свиной/NY/03/2009 Zeptomatrix 0810249CF		3,3E+02 копий/мл (5,0E-01 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Грипп А Н3	Грипп H3N2 A/Порт Чалмерс/1/73 ATCC VR-810		2,1E+01 копий/мл (1,0E-01 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Грипп В	B/FL/04/06 Zeptomatrix 0810255CF		3,4E+01 копий/мл (5,0E+00 ЦПД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Вирус парагриппа 1	Тип 1 Zeptomatrix 0810014CF		1,0E+03 копий/мл (5,0E+00 ЦПД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Вирус парагриппа 2	Тип 2 Zeptomatrix 0810015CF		3,0E+01 копий/мл (5,0E-01 ЦПД ₅₀ /мл)	19 из 20 95,0%
Вирус парагриппа 3	Тип 3 Zeptomatrix 0810016CF		3,8E+01 копий/мл (2,5E+00 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Вирус парагриппа 4	Тип 4a Zeptomatrix 0810060CF		1,6E+03 копий/мл (5,0E+01 ЦПД ₅₀ /мл)	19 из 20 95,0%
Респираторно-синцитиальный вирус	Тип А Zeptomatrix 0810040ACF		9,0E+00 копий/мл (2,0E-02 ТЦД ₅₀ /мл)	20 из 20 100%
Бактерии				
<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)	A747 Zeptomatrix 0801461		6,0E+01 IS1001 копий/мл (4,1E+01 КОЕ/мл) ^e	20 из 20 100%
<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)	A639 Zeptomatrix 0801459		1,0E+03 КОЕ/мл	19 из 20 95,0%
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	TW183 ATCC VR-2282		1,3E+02 копий/мл*	20 из 20 100%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 Zeptomatrix 0801579		4,6E+02 копий/мл	20 из 20 100%

[‡] ME = международные единицы.

[§] Компания BioFire Diagnostics выполнила количественное определение международного стандарта ВОЗ с использованием количественной ПЦР в реальном времени для демонстрации того, что 3,0E+03 ME/мл = 3,0E+03 копий/мл. Обнаружение в ≥95% из 20 повторностей было подтверждено для двух других серотипов аденовируса (B7 и F41) в концентрациях, подобных LoD, установленному с международным стандартом (8,7E+02 копий/мл и 1,1E+03 копий/мл соответственно).

[†] Концентрация вирусной РНК была определена цифровой капельной ПЦР, как указано в сертификате анализа от ATCC.

[‡] Патогенный вирус был получен от Международного референс-центра по возникающим вирусам и арбовирусам (WRCEVA; от центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC) США). Вирус культивировался, количественно определялся и тестировался в лабораториях 3-го уровня биозащиты. Концентрация вирусной РНК была определена количественной ПЦР в реальном времени с использованием праймеров гена E и зонда, как описано на веб-сайте Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ): <https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/protocol-v2-1.pdf>.

[‡] Концентрация в копиях/мл для культуры, тестируемой с использованием BioFire RP2.1plus, не определялась, но соответствующая концентрация LoD FilmArray RP2plus для метапневмовируса человека составляет 1,2E+03 копий/мл (на основании тестирования другой культуры того же изолята).

^{*} Последовательности IS1001 могут присутствовать в более чем одной копии на клетку, поэтому отношение между КОЕ/мл и копий/мл может отличаться между штаммами и между культурами. Значение LoD было определено на основе числа копий IS1001, измеренного с помощью количественной ПЦР в реальном времени.

^{*} Концентрация LoD в копиях/мл для *Chlamydia pneumoniae* в 2 раза выше, чем концентрация LoD в копиях/мл для FilmArray RP2plus.

ПРИМЕЧАНИЕ. Концентрации LoD культивированных вирусов указаны в единицах ТЦД₅₀ (тканевая цитопатическая доза 50%) и представляют собой не непосредственное количество вирусов или клеток, а непрямую меру концентрации вирусов на основе инфекционности или цитотоксичности, поэтому она будет значительно отличаться в зависимости от техники и методологии (включая тип клетки, культуральную среду и условия, цитотоксичность вируса и т.д.). Не следует делать оценку относительной чувствительности различных молекулярных анализов на основе значений LoD, измеренных в ТЦД₅₀/мл. Концентрации LoD также указаны в единицах копий/мл на основе количественных анализов ПЦР (qPCR) в реальном времени. Обратите внимание, что на точность анализов qPCR могут влиять условия анализа и изменение последовательностей между штаммами.

Аналитическая реактивность (инклюзивность)

Аналитическая реактивность (инклюзивность) анализов BioFire RP2.1plus оценивалась анализом *in silico* и тестированием 180 различных вирусных и бактериальных изолятов или образцов. Тестируемые изоляты представляют временное и географическое разнообразие аналитов, включая релевантные виды, штаммы, серотипы или генотипы. Каждый изолят тестировался трижды при концентрации, близкой к LoD, с использованием либо BioFire RP2.1plus, либо FilmArray RP2plus. Все изоляты были обнаружены в концентрациях в пределах 10× LoD (Таблица 24-Таблица 35).

Анализ *in silico* данных о последовательностях использовался для прогнозирования реактивности для всех анализов, и даются примечания по прогнозам *in silico* для менее распространенных штаммов или серотипов, которые не проходили тестирование и/или когда характеризующиеся изоляты не были доступны для тестирования (например, SARS-CoV-2, Таблица 36).

ПРИМЕЧАНИЕ. Анализы BioFire RP2.1plus на вирус гриппа А будут по-разному вступать в реакции с вирусами гриппа А, не относящимися к человеку, и с редко встречающимися вирусами гриппа А, не принадлежащими видам H1, H1-2009 или H3. В общем случае тест будет давать результаты Influenza A Equivocal (Грипп А: сомнительный) или Influenza A (no subtype detected) (Грипп А (подтипы не обнаружены)).

ПРИМЕЧАНИЕ. Прогнозируется, что анализы панели BioFire RP2.1plus на грипп А (подтип), грипп В будут реагировать с ослабленными вирусами, используемыми в вакцинах от гриппа. Прогнозируется, что анализ на риновирус/энтеровирус человека будет реагировать с нуклеиновыми кислотами в вакцинах от полиовируса, а анализ на Bordetella pertussis (ptxP) может реагировать с нуклеиновыми кислотами в вакцинах от коклюша.

Таблица 24. Реактивность анализа на аденовирус (протестированные и обнаруженные изоляты)

Вид	Серотип*	Идентификатор/ источник изолята	[Штамм/ местоположение/год]	Концентрация обнаружения, xLoD ⁵	Результат
А	12	ATCC VR-863	[Huie/Массачусетс]	3x	Аденовирус Detected (Обнаружен)
	18	ATCC VR-19	[Вашингтон, округ Колумбия/1954]	3x	
	31	Zeptomatrix 0810073CF	—	3x	
	3	Zeptomatrix 0810062CF	—	3x	
В	7A	Zeptomatrix 0810021CF	—	<1x	
	7d/d2	Исследовательский фонд Университета Айовы	[Айова/2001]	3x	
	7h	Исследовательский фонд Университета Айовы	[Айова/1999]	3x	
	11	ATCC VR-12	[Slobitski]	3x	
	14	ATCC VR-15	[De Wit/Нидерланды/1955]	3x	
	16	ATCC VR-17	[CH.79/Саудовская Аравия/1955]	3x	
	21	ATCC VR-1833	[128/Саудовская Аравия/1956]	3x	

Вид	Серотип ^a	Идентификатор/ источник изолята	[Штамм/ местоположение/год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^b	Результат
C	34	ATCC VR-716	[Compton/1972]	3x	
	35	ATCC VR-718	[Holden]	3x	
	50	ATCC VR-1602	[Van/Амстердам/1988]	3x	
	1	Zeptomatrix 0810050CF	—	3x	
	2	ATCC VR-846	[Adenoid 6]	3x	
		NIBSC 16/324	—	1x	
	5	Zeptomatrix 0810020CF	—	3x	
D	6	ATCC VR-6	[Tonsil 99/Вашингтон, округ Колумбия]	3x	
	8	Zeptomatrix 0810069CF	—	3x	
	20	Zeptomatrix 0810115CF	—	3x	
E	37	Zeptomatrix 0810119CF	—	3x	
	4a	Исследовательский фонд Университета Айовы	[Южная Каролина/2004]	3x	
	4	Zeptomatrix 0810070CF	—	3x	
F		Zeptomatrix 0810084CF	—	3x	
	40	NCPV 0101141v	—	3x	
	41	ATCC VR-930	[Tak/73-3544/Нидерланды/1973]	<1x	
		Zeptomatrix 0810085CF	—	3x	

^a По результатам анализа *in silico* доступных последовательностей прогнозируется, что тесты на аденовирус BioFire RP2.1plus будут вступать в реакцию с аденовирусом B55, C57, серотипами вида D, а также G52.

^b Все изоляты аденовируса были протестированы с использованием BioFire RP2.1plus на уровне 3x LoD, установленном международным стандартным ВОЗ (3,0E+03 ME или копий/мл) или менее.

Таблица 25. Реактивность анализа на коронавирус (протестированные и обнаруженные изоляты/образцы)

Тип коронавируса	Идентификатор/источник изолята	[Местоположение/ год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^a	Результат
229E	ATCC VR-740	—	1x	Коронавирус 229E
	Zeptomatrix 0810229CF	—	3x	
HKU1	Клинический образец	[Юта/2015]	1x	Коронавирус HKU1
	Клинический образец	[Юта/2015]	3x	
	Клинический образец	[Юта/2015]	3x	
	Клинический образец	[Южная Каролина/2010]	3x	
	Клинический образец	[Детройт/2010]	3x	
NL63	BEI NR-470	[Амстердам/2003]	1x	Коронавирус NL63
	Zeptomatrix 0810228CF	—	3x	
OC43	ATCC VR-759 ^b	—	1x	Коронавирус OC43
	Zeptomatrix 0810024CF	—	3x	
MERS-CoV	BEI NR-50171 (инактивированный нагреванием)	EMC/2012 [Саудовская Аравия/2012]	1x	Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV)
	Zeptomatrix 0810575CFHI (инактивированный нагреванием)	Флорида/США-2_ Саудовская Аравия 2014	3x ^c	
SARS-CoV-2 ^r	ATCC VR-1986 НК (инактивированный нагреванием)	[USA-WA1/2020]	1x	Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2)

^a Образцы при концентрации 1x LoD проходили анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1plus.

^b Прекращено использование этого номера по каталогу; см. ATCC VR-1558.

^c Образец при концентрации 3x LoD проходил анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1plus.

^r Дополнительные прогнозы по реактивности SARS-CoV-2 на основании анализа *in silico* см. в Таблица 36.

Таблица 26. Реактивность метапневмовируса человека (протестированные и обнаруженные изоляты)

Генотип	Серотип	Идентификатор/источник изолята	[Местоположение/год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^a	Результат
A1	16	Zeptomatrix 0810161CF	[Айова10/2003]	1x	Метапневмовирус человека
	9	Zeptomatrix 0810160CF	[Айова3/2002]	3x	
A2	20	Zeptomatrix 0810163CF	[Айова14/2003]	3x	
	27	Zeptomatrix 0810164CF	[Айова27/2004]	3x	
B1	3	Zeptomatrix 0810156CF	[Перу2/2002]	3x	
	5	Zeptomatrix 0810158CF	[Перу3/2003]	3x	
	13	Исследовательский фонд Университета Айовы	[Айова7/2003]	3x	
B2	4	Zeptomatrix 0810157CF	[Перу1/2002]	3x	
	8	Zeptomatrix 0810159CF	[Перу6/2003]	3x	
	18	Zeptomatrix 0810162CF	[Айова18/2003]	3x	
	22	Исследовательский фонд Университета Айовы	[Айова16/2003]	3x	

^a Образец при концентрации 1x LoD проходил анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1plus.

Таблица 27. Реактивность риновируса и энтеровируса человека (протестированные и обнаруженные изоляты)^a

Вид	Серотип	Идентификатор /источник изолята	[Штамм/местоположение/ год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^c	Результат
Риновирус человека					
A	1	Zeptomatrix 0810012CFN	[1A]	1x	Риновирус/ энтеровирус человека
	2	ATCC VR-482	[HGP]	3x	
	7	ATCC VR-1601	[68-CV11]	3x	
	16	ATCC VR-283	[11757/Вашингтон, округ Колумбия/1960]	3x	
	34	ATCC VR-507 ^a	[137-3]	3x	
	57	ATCC VR-1600	[Ch47]	3x	
	77	ATCC VR-1187	[130-63]	3x	
	85	ATCC VR-1195	[50-525-CV54]	3x	
B	3	ATCC VR-483	[FEB]	3x	
	14	ATCC VR-284	[1059/Южная Каролина/1959]	3x	
	17	ATCC VR-1663	[33342/Северная Каролина/1959]	3x	
	27	ATCC VR-1137	[5870]	3x	
	42	ATCC VR-338	[56822]	3x	
	83	ATCC VR-1193	[Baylor 7]	3x	
	Энтеровирус				
A	Вирус Коксаки 10	ATCC VR-168	[Нью-Йорк/1950]	3x	Риновирус/ энтеровирус человека
	Энтеровирус 71	ATCC VR-1432	[H]	3x	
B	Вирус Коксаки A9	Zeptomatrix 0810017CF	—	3x	
	Вирус Коксаки B3	Zeptomatrix 0810074CF	—	3x	
	Вирус Коксаки B4	Zeptomatrix 0810075CF	—	3x	
	Эховирус 6	Zeptomatrix 0810076CF	—	3x	
	Эховирус 9	Zeptomatrix 0810077CF	—	3x	
	Эховирус 11	Zeptomatrix 0810023CF	—	3x	
C	Вирус Коксаки A21	ATCC VR-850	[Kuykendall/Калифорния/ 1952]	3x	
	Вирус Коксаки A24	ATCC VR-583	[DN-19/Техас/1963]	3x	
D	68	ATCC VR-1823	[US/MO/2014-18947]	1x	

^a Анализ последовательностей прогнозирует, что анализ HRV/EV может реагировать с нуклеиновыми кислотами в полиовакцинах.

^b Образцы при концентрации 1x LoD проходили анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1plus.

^c Номер приостановленной части; см. ATCC VR-1365.

Таблица 28. Реактивность анализа на грипп А и грипп А H1/H1-2009/H3 (протестированные и обнаруженные изоляты)

Тип	Идентификатор/источник изолята	[Штамм/местоположение/год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^a	Результат
H1N1	Человеческий	Zeptomatrix 0810036CF	[Новая Каледония/20/1999]	1x
		ATCC VR-219	[NWS/1933]	3x
		ATCC VR-95	[PR/8/1934]	10x ^b

Тип	Идентификатор/источник изолята	[Штамм/местоположение/год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^a	Результат
	Свиной	ATCC VR-96	[Weiss/1943]	3x
		ATCC VR-97	[FM/1/1947]	3x
		ATCC VR-98	[Mal/302/1954]	3x
		ATCC VR-546	[Денвер/1/1957]	3x
		Zeptomatrix 0810036CFN	[Соломоновы Острова/03/2006]	3x
		Zeptomatrix 0810244CF	[Брисбен/59/2007]	3x
		ATCC VR-333	[А/Свиной/Айова/15/1930]	3x
		ATCC VR-99	[А/Свиной/1976/1931]	3x
		ATCC VR-897	[А/Нью-Джерси/8/76 (Hsw1N1)]	10x ^b
H1N2	Рекомбинантный	BEI NR-9677 ^a	[Kilbourne F63, A/NWS/1934 (HA) x A/Рокфеллеровский институт/5/1957 (NA)]	3x
H1N1 pdm09	Человеческий	Zeptomatrix 0810249CFN	[SwineNY/03/2009]	1x
		Zeptomatrix 0810248CFN	[SwineNY/01/2009]	3x
		Zeptomatrix 0810109CFN	[SwineNY/02/2009]	3x
		Zeptomatrix 0810109CFJ	[Канада/6294/2009]	3x
		Zeptomatrix 0810165CF	[Калифорния/07/2009]	3x
		Zeptomatrix 0810166CF	[Мексика/4108/2009]	3x
		BEI NR-19823	[Нидерланды/2629/2009]	3x
		BEI NR-44345	[Гонконг/H090-761-V1(0)/2009]	10x ^c
		BEI NR-42938	[Джорджия/F32551/2012]	3x
H3N2	Человеческий	ATCC VR-810	[Порт Чалмерс/1/1973]	1x
		ATCC VR-776	[Alice (живая ослабленная вакцина)]	3x
		Zeptomatrix 0810238CF	[Техас/50/2012]	3x
		ATCC VR-547	[Айти/2/1968]	3x
		ATCC VR-544	[Гонконг/8/1968]	3x
		ATCC VR-822	[Виктория/3/1975]	3x
		Zeptomatrix 0810252CF	[Висконсин/67/2005]	3x
		Zeptomatrix 0810138CF	[Брисбен/10/2007]	3x
	Рекомбинантный	ATCC VR-777	[MCR2(A/Англия/42/72xA/PR8/34)]	3x
H3N2v ^d	Человеческий	Клинический образец	[Огайо/2012]	3x
	Человеческий	BEI NR-2775 ^e	[Япония/305/1957]	10x ^c
H2N2	Рекомбинантный	BEI NR-9679 ^e	[Корея/426/1968xПуэрто-Рико/8/1934]	10x ^c
H2N3		MRI Global ^g	[Mallard/Альберта/79/2003]	3x
H5N1	Птичий	MRI Global ^g	[А/Курица/Юньнань/1251/2003]	3x
H5N2		MRI Global ^g	[A/Northern pintail/Вашингтон/40964/2014]	3x
H5N3		BEI NR-9682 ^h	[A/Duck/Сингапур/645/1997]	3x
H5N8		MRI Global ^g	[Gyrfalcon/Вашингтон/41088-6/2014]	3x
H7N7		MRI Global ^g	[A/Нидерланды/219/2003]	3x
H7N9		MRI Global ^g	[A/Аньхой/01/2013]	3x
H10N7		BEI NR-2765 ⁱ	[Курица/Германия/N/49]	3x

^a Образцы при концентрации 1x LoD проходили анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1 plus.

^b Определен как Influenza A (no subtype detected) (Грипп А (подтипы не обнаружены)) при концентрации 3xLoD.

^c Геномная РНК, полученная от BEI Resources, NIAID, NIH: Kilbourne F63: A/NWS/1934 (HA) x A/Рокфеллеровский институт/5/1957 (NA) (H1N2), Reassortant NWS-F, NR-9677.

^d Определен как Грипп А: Equivocal (сомнительный) или Грипп А (подтипы не обнаружены) при концентрации 3xLoD.

^e Изолят человека недавнего свиного варианта вируса H3N2.

^f Геномная РНК, полученная от BEI Resources, NIAID, NIH: геномная РНК вируса гриппа А, А/Япония/305/1957 (H2N2), NR-2775.

^g Геномная РНК, полученная от BEI Resources, NIAID, NIH: геномная РНК, полученная от Kilbourne F38: A/Корея/426/1968 (HA, NA) x A/Пуэрто-Рико/8/1934 (H2N2), NR-9679.

^h Изолят, полученный и протестированный MRI Global, Канзас-Сити, Миссури.

ⁱ Геномная РНК, полученная от BEI Resources, NIAID, NIH: геномная РНК, полученная от Kilbourne F181: A/утка/Сингапур/645/1997 (H5N3), дикий тип, NR-9682.

^j Геномная РНК, полученная от BEI Resources, NIAID, NIH: геномная РНК вируса гриппа А, А/курица/Германия/N/1949 (H10N7), NR-2765.

Таблица 29. Реактивность гриппа В (протестированные и обнаруженные изоляты)

Линия дифференцировки	Идентификатор/источник изолята	[Штамм/местоположение/год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^a	Результат
Не применимо	ATCC VR-101	[Lee/1940]	3x	Грипп В
	ATCC VR-102	[Allen/1945]	3x	
	ATCC VR-103	[GL/1739/1954]	3x	
	ATCC VR-296	[1/Мэриленд/1959]	3x	
	ATCC VR-295	[2/Тайвань/1962]	3x	
	ATCC VR-786	[Brigit/Россия/1969]	3x	
Victoria	ATCC VR-823	[5/Гонконг/1972]	3x	
	Zeptomatrix 0810258CF	[2506/Малайзия/2004]	3x	
	CDC 2005743348	[1/Огайо/2005]	3x	
Yamagata	Zeptomatrix 0810256CF	[07/Флорида/2004]	3x	
	Zeptomatrix 0810255CF	[04/Флорида/2006]	1x	
	Zeptomatrix 0810241CF	[1/Висконсин/2010]	3x	
	Zeptomatrix 0810239CF	[2/Массачусетс/2012]	3x	

^a Образец при концентрации 1x LoD проходил анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1 plus.

Таблица 30. Реактивность вируса парагриппа (протестированные и обнаруженные изоляты)

Тип	Подтип	Идентификатор/источник изолята	[Штамм/местоположение/год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^a	Результат
1		Zeptomatrix 0810014CF	—	1x	Вирус парагриппа 1
		ATCC VR-94	[C-35/Вашингтон, округ Колумбия/1957]	3x	
		BEI NR-3226 ⁶	[C39]	3x	
		BEI NR-48680	[FRA/29221106/2009]	3x	
2		Zeptomatrix 0810015CF	—	1x	Вирус парагриппа 2
		ATCC VR-92	[Greer/Огайо/1955]	3x	
3		Zeptomatrix 0810016CF	—	1x	Вирус парагриппа 3
		ATCC VR-93	[C-243/Вашингтон, округ Колумбия/1957]	3x	
		BEI NR-3233	[NIH 47885, Wash/47885/57]	3x	
4	A	Zeptomatrix 0810060CF	—	1x	Вирус парагриппа 4
		ATCC VR-1378	[M-25/1958]	3x	
	B	Zeptomatrix 0810060BCF	—	3x	
		ATCC VR-1377	[CH-19503/Вашингтон, округ Колумбия/1962]	3x	

^a Образцы при концентрации 1x LoD проходили анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1 plus.

⁶ Прекращено использование этого номера по каталогу.

Таблица 31. Реактивность респираторно-синцитиального вируса (протестированные и обнаруженные изоляты)

Тип	Источник	[Штамм/местоположение/год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^a	Результат
A	Zeptomatrix 0810040ACF	[2006]	1x	Респираторно-синцитиальный вирус
	ATCC VR-26	[Long/Мэриленд/1956]	3x	
	ATCC VR-1540	[A2/Мельбурн/1961]	3x	
B	Zeptomatrix 0810040CF	[Ch-93 (18)-18]	3x	
	ATCC VR-1400	[WV/14617/1985]	3x	
	ATCC VR-955	[9320/Массачусетс/1977]	3x	
	ATCC VR-1580	[18537/Вашингтон, округ Колумбия/1962]	10x	

^a Образец при концентрации 1x LoD проходил анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1 plus.

Таблица 32. Реактивность *Bordetella parapertussis* (IS1001) (протестированные и обнаруженные изоляты)

Вид	Источник	[Штамм/местоположение/год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^a	Результат
<i>Bordetella parapertussis</i>	Zeptomatrix 0801461	[A747]	1x	<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)
	Zeptomatrix 0801462	[E595]	3x	
	ATCC 15237	[NCTC 10853]	3x	
	ATCC 15311	[NCTC 5952]	3x	
	ATCC BAA-587	[12822/Германия/1993]	3x	
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ^b (содержащая IS1001)	NRRL B-59909	[MBORD849/свинья/Нидерланды]	3x	

^a Образец при концентрации 1x LoD проходил анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1plus.

^b Реактивность с последовательностями IS1001 в *B. bronchiseptica* представляет предполагаемую реактивность анализа, однако аналит будет неверно определен в качестве *B. parapertussis*. Анализ не вступает в реакцию с последовательностями, напоминающими IS1001 в *B. holmesii*.

Таблица 33. Реактивность *Bordetella pertussis* (ptxP) (протестированные и обнаруженные изоляты)^a

Идентификатор/источник изолята	[Штамм]	Концентрация обнаружения, xLoD ^b	Результат
Zeptomatrix 0801459	[A639]	1x	<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)
Zeptomatrix 0801460	[E431]	3x	
ATCC 8467	[F]	3x	
ATCC 9340	[5,17921]	3x	
ATCC 9797	[18323/NCTC 10739]	3x	
ATCC 10380	[10-536]	3x	
ATCC 51445	[CNCTC Hp 12/63,623]	3x	
ATCC BAA-589	[Tohama]	3x	
ATCC BAA-1335	[MN2531]	3x	

^a Анализ ptxP может реагировать с вакцинами от коклюша.

^b Образец при концентрации 1x LoD проходил анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1plus.

Таблица 34. Реактивность *Chlamydia pneumoniae* (протестированные и обнаруженные изоляты)

Идентификатор/источник изолята	[Штамм/местоположение/год]	Концентрация обнаружения, xLoD ^a	Результат
ATCC VR-2282	[TW-183/Тайвань/1965]	1x	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
ATCC VR-1310	[CWL-029]	3x	
ATCC VR-1360	[CM-1/Джорджия]	3x	
ATCC 53592	[AR-39/Сизтл/1983]	3x	

^a Все изоляты *C. pneumoniae* проходили анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1plus.

Таблица 35. Реактивность *Mycoplasma pneumoniae* (протестированные и обнаруженные изоляты)

Тип	Идентификатор/источник изолята	[Штамм]	Концентрация обнаружения, xLoD ^a	Результат
1	Zeptomatrix 0801579	[M129]	1x	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
	ATCC 29342	[M129-B7]	3x	
	ATCC 29085	[PI 1428]	3x	
2	ATCC 15531	[штамм FH агента Итона [NCTC 10119]	3x	
	ATCC 15492	[Mac]	3x	
	ATCC 15293	[M52]	3x	
неизвестно	ATCC 15377	[Bru]	3x	
	ATCC 39505	[Mutant 22]	3x	
	ATCC 49894	[UTMB-10P]	3x	

^a Образец при концентрации 1x LoD проходил анализ и обнаружение с использованием BioFire RP2.1plus.

Прогнозы реактивности *in silico* для анализов на коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2)

Оценка аналитической реактивности для анализов BioFire RP2.1plus SARS-CoV-2 (SARSCoV2-1 и SARSCoV2-2) была основана на анализе последовательностей *in silico* всех доступных последовательностей в базах данных NCBI и GISAID по состоянию на 3 мая 2020 г. Всего 15 370 последовательностей со всего мира были сопоставлены с праймерами анализа, и менее чем у 0,1% (16 из 15 370) было обнаружено несоответствующее основание в

пределах половины одного или нескольких праймеров 3', которое могло оказать влияние на амплификацию одним из анализов. Все шестнадцать последовательностей с несоответствующим основанием 3' в одном анализе на 100% идентичны всем праймерам другого анализа.

Этот анализ установил, что все оцениваемые последовательности базы данных будут амплифицированы одним или обоими анализами SARS-CoV-2, и прогнозируется, что все последовательности (15 370 из 15 370; 100%) будут обнаружены BioFire RP2.1plus (Таблица 36).

Таблица 36. Прогнозирование обнаружения SARS-CoV-2 *in silico* анализами BioFire RP2.1plus

+/- обозначает обнаружение обоими анализами без нарушений, +/- обозначает обнаружение одним анализом без нарушения и потенциальное нарушение обнаружения вторым анализом, -- обозначает потенциальное нарушение обнаружения обоими анализами

Прогнозируемый результат анализа	Количество последовательностей	SARSCoV2-1		Количество (%) последовательностей, для которых прогнозируется обнаружение (один или оба анализа положительные)
		+	-	
SARSCoV2-2	+	15 354	13	15 370 из 15 370 (100%)
	-	3	0	

Аналитическая специфичность (перекрестная реактивность)

Возможность неспецифической амплификации и обнаружения с помощью BioFire RP2.1plus была оценена в анализе *in silico* доступных последовательностей и также путем тестирования высоких концентраций микроорганизмов. Внутритестовые микроорганизмы были протестированы для оценки потенциала внутритестовой перекрестной реактивности, а внетестовые микроорганизмы были протестированы для оценки специфичности панели. Внетестовые организмы включали нормальную флору дыхательных путей и патогены, которые могут присутствовать в образцах МНГ, а также родственные виды или образцы, генетически связанных с организмами, обнаруженными BioFire RP2.1plus. Каждый микроорганизм тестировался трижды, бактерии и грибы обычно тестировались на уровне $\geq 1,0E+07$ единиц/мл, а вирусы тестировались на уровне $\geq 1,0E+05$ единиц/мл.

Анализ *in silico* и тестирование идентифицировали риск перекрестной реактивности анализа SARS-CoV-2 с несколькими последовательностями SARS-подобных вирусов, выделенных у летучих мышей и панголина, а также внутритестовую перекрестную реактивность с видом *Bordetella* и подтипами гриппа А свиного происхождения. Сводные данные по потенциальной перекрестной реактивности приводятся в Таблица 37, и внутритестовые и внетестовые изоляты и концентрации, проходившие тестирование, перечислены в Таблица 38 и Таблица 39 соответственно.

Таблица 37. Прогнозируемая и наблюдаемая перекрестная реактивность BioFire RP2.1plus

Перекрестно-реактивные микроорганизмы/последовательности	Результат BioFire RP2.1plus	Описание
Коронавирус летучей мыши_RaTG13 (учетный номер последовательности MN996532) Коронавирус панголина (учетный номер последовательности MT08407) SARS-подобный коронавирус летучей мыши (учетный номер последовательности MG772933 и MG772934)	Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2)	Анализ SARS-CoV-2 могут амплифицировать небольшой выбор последовательностей от близкородственных Sarbecovirus, выделенных у летучих мышей и панголина. Прогнозируется, что анализ SARSCoV2-2 будет перекрестно реагировать со всеми четырьмя последовательностями, тогда как SARSCoV2-1, скорее всего, будет перекрестно реагировать только с коронавирусом летучей мыши_RaTG13.
Виды <i>Bordetella</i>, не связанные с коклюшем (например, <i>Bordetella parapertussis</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> ^a)	<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)⁶	Возможна амплификация при анализе <i>Bordetella pertussis</i> (ptxP) последовательностей псевдогена токсина коклюша в <i>B. bronchiseptica</i> и <i>B. parapertussis</i> главным образом при наличии в высоких концентрациях ($\geq 1,2E+09$ КОЕ/мл).

Перекрестно-реактивные микроорганизмы/последовательности	Результат BioFire RP2.1plus	Описание
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ^a (с последовательностями IS1001)	<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)	Некоторые штаммы <i>B. bronchiseptica</i> содержат вставочные последовательности IS1001, идентичные содержащимся в <i>B. parapertussis</i> . Такие последовательности будут эффективно амплифицированы анализом на IS1001 и определены тестом BioFire RP2.1plus в качестве <i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001).
<i>Bordetella pertussis</i> <i>Bordetella parapertussis</i> ^b <i>Bordetella bronchiseptica</i> ^b	Риновирус/энтеровирус человека ^c	При анализе на риновирус/энтеровирус человека возможна амплификация внецелевых последовательностей, обнаруженных в штаммах <i>B. pertussis</i> , <i>B. bronchiseptica</i> и <i>B. parapertussis</i> при наличии в высоких концентрациях. Перекрестная реактивность с участием <i>B. pertussis</i> наблюдалась при концентрациях 4,5E+07 КОЕ/мл и выше.
Грипп А H1N1 (свиного происхождения)	Грипп А H1-2009 ^d	Анализ на грипп А H1-2009 может вступать в реакцию с последовательностями гена гемоглиутинина H1 от вирусов свиного происхождения. BioFire RP2.1plus будет определять грипп А H1 или грипп А H1-2009, в зависимости от штамма и концентрации в образце.

^a Инфекция *B. bronchiseptica* редко встречается у людей и больше распространена у домашних животных («вольерный кашель»).

^b Перекрестная реактивность между анализом на *Bordetella pertussis* (ptxP) и *B. parapertussis* будет определена в качестве сочетания обнаружения (Detected (Обнаружен)) для *Bordetella parapertussis* (IS1001) и Detected (Обнаружен) для *Bordetella pertussis* (ptxP); тогда как перекрестная реактивность с большинством штаммов *B. bronchiseptica* (которые не содержат IS1001) будет определена в качестве результата Detected (Обнаружен) для *Bordetella pertussis* (ptxP).

^c Перекрестная реактивность с *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* спрогнозирована на основании анализа *in silico*, но не наблюдалась при тестировании изолятов в концентрации >2,0E+09 КОЕ/мл.

^d Перекрестная реактивность между анализом на риновирус/энтеровирус человека и *B. pertussis* или *B. parapertussis* будет определена в качестве сочетания обнаружения (Detected (Обнаружен)) для *Bordetella pertussis* (ptxP) и Риновирус/энтеровирус человека Detected (Обнаружен) или Detected (Обнаружен) для *Bordetella parapertussis* (IS1001) и Риновирус/энтеровирус человека Detected (Обнаружен); тогда как перекрестная реактивность с большинством штаммов *B. bronchiseptica* (которые не содержат IS1001) будет определена только в качестве результата Риновирус/энтеровирус человека Detected (Обнаружен).

^e Ген гемоглиутинина H1 (HA) штаммов гриппа А H1N1 свиного происхождения (до 2009 г.) будет амплифицироваться анализом H1 (Грипп А H1 Detected (Обнаружен)). Однако некоторые штаммы/последовательности свиного происхождения могут также амплифицироваться анализом H1-2009 (Грипп А H1-2009 Detected (Обнаружен)) при высокой концентрации (≥8,9E+06 CEID (инфицирующая доза для куриных эмбрионов)₅₀/мл).

Таблица 38. Тестирование внутритестовых микроорганизмов для оценки аналитической специфичности BioFire RP2.1plus

Микроорганизм		Идентификатор изолята	Тестируемая концентрация	Обнаруженная перекрестная реактивность
Бактерии				
Bordetella parapertussis		Zeptomatrix 0801462	6,43E+09 КОЕ/мл	Bordetella pertussis (ptxP) ^a
Bordetella pertussis		ATCC 9797	5,50E+09 КОЕ/мл	Риновирус/энтеровирус человека ^b
Chlamydia pneumoniae		ATCC 53592	1,93E+07 ИЕ/мл	Нет
Mycoplasma pneumoniae		Zeptomatrix 0801579	2,65E+07 ЕИЦ/мл	Нет
Вирусы				
Аденовирус	7A (вид В)	Zeptomatrix 0810021CF	1,02E+07 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
	1 (вид С)	Zeptomatrix 0810050CF	2,26E+07 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
	4 (вид Е)	ATCC VR-1572	1,58E+06 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Коронавирус 229Е		Zeptomatrix 0810229CF	1,13E+05 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Коронавирус HKU1		Клинический образец	8,94E+06 копий РНК/мл	Нет
Коронавирус NL63		Zeptomatrix 0810228CF	2,34E+05 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Коронавирус OC43		Zeptomatrix 0810024CF	6,37E+06 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV)		BEI NR-44260 EMC/2012	2,7E+09 копий/мл	Нет
Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2)		USA-WA1/2020	2,4E+09 копий/мл	Нет
Метапневмовирус человека		Zeptomatrix 0810159CF	1,05E+06 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Риновирус человека (Тип 1А)		Zeptomatrix 0810012CFN	8,40E+05 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Энтеровирус (D68)		ATCC VR-1823	1,58E+07 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Грипп А H1N1 (A1/FM1/47)		ATCC VR-97	1,58E+08 CEID (инфицирующая доза для куриных эмбрионов) ₅₀ /мл	Нет

Микроорганизм	Идентификатор изолята	Тестируемая концентрация	Обнаруженная перекрестная реактивность
Грипп А Hsw N1 (А/Нью-Джерси/8/76)	ATCC VR-897	8,89E+06 CEID (инфицирующая доза для куриных эмбрионов) ₅₀ /мл	Грипп А H1-2009 ^a
Грипп А H1N1 pdm09 (Мичиган/45/15)	Zeptomatrix 0810538CF	9,40E+04 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Грипп А H3N2 (А/Alice)	ATCC VR-776	3,33E+08 CEID (инфицирующая доза для куриных эмбрионов) ₅₀ /мл	Нет
Грипп В (Массачусетс/2/12)	Zeptomatrix 0810239CF	9,55E+05 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Вирус парагриппа 1	Zeptomatrix 0810014CF	6,80E+07 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Вирус парагриппа 2	Zeptomatrix 0810357CF	4,57E+06 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Вирус парагриппа 3	ATCC VR-93	6,80E+07 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Вирус парагриппа 4	ATCC VR-1377	4,17E+04 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Респираторно-синцитиальный вирус	Zeptomatrix 0810040ACF	7,00E+05 ТЦД ₅₀ /мл	Нет

^a Анализ *in silico* и тестирование свидетельствуют в поддержку того, что анализ на *Bordetella pertussis* (ptxP) может амплифицировать последовательности псевдогена токсина коклюша из некоторых штаммов *B. parapertussis* при высокой концентрации (>1,2E+09 КОЕ/мл).

^b Анализ *in silico* тестирование свидетельствуют в поддержку того, что анализ на риновирус/энтеровирус человека может амплифицировать нецелевые последовательности от видов *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*) в концентрации ≥4,5E+07 КОЕ/мл.

^c Тестирование этого штамма при 8,89E+06 CEID (инфицирующая доза для куриных эмбрионов)₅₀/мл дало результат Грипп А H1 Detected (Обнаружен) в 1 из 3 повторностей и Грипп А H1-2009 Detected (Обнаружен) в 2 из 3 повторностей.

Таблица 39. Тестирование внетестовых микроорганизмов для оценки аналитической специфичности BioFire RP2.1plus

Микроорганизм	Идентификатор изолята	Тестируемая концентрация	Обнаруженная/прогнозируемая перекрестная реактивность
Бактерии			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055	5,15E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	ATCC 9345	5,70E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Bacillus anthracis</i>	Оценивалось <i>in silico</i>		Нет
<i>Bordetella avium</i>	ATCC 35086	1,88E+09 клеток/мл	Нет
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC 10580	2,09E+09 клеток/мл	<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)
<i>Bordetella hinzii</i>	ATCC 51783	4,30E+06 КОЕ/мл	Нет
<i>Bordetella holmesii</i>	ATCC 700052	3,15E+07 КОЕ/мл	Нет
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 17762	5,04E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Zeptomatrix 0801775	1,67E+08 ИЕ/мл	Нет
<i>Chlamydia psittaci</i>	Оценивалось <i>in silico</i>		Нет
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Zeptomatrix 0801882	7,47E+08 КОЕ/мл	Нет
<i>Corynebacterium striatum</i>	ATCC BAA-1293	5,20E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Coxiella burnetii</i>	Оценивалось <i>in silico</i>		Нет
<i>Escherichia coli</i>	AR Bank #0538	5,53E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	ATCC 27852	1,33E+08 клеток/мл	Нет
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 33391	5,85E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Klebsiella (Enterobacter) aerogenes</i>	AR Bank #0074	6,83E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Klebsiella oxytoca</i>	JMI 7818	5,60E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCTC 13465	1,75E+08 КОЕ/мл	Нет
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Zeptomatrix 0801540	1,60E+08 КОЕ/мл	Нет
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Zeptomatrix 0801507	1,20E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Legionella (Fluoribacter) bozemanii</i>	ATCC 33217	3,24E+09 клеток/мл	Нет
<i>Legionella (Fluoribacter) dumoffii</i>	ATCC 33279	2,65E+09 клеток/мл	Нет
<i>Legionella feeleii</i>	ATCC 35849	1,49E+09 клеток/мл	Нет
<i>Legionella longbeachae</i>	Zeptomatrix 0801577	1,93E+08 КОЕ/мл	Нет
<i>Legionella (Tatlockia) micdadei</i>	Zeptomatrix 0801576	1,80E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Legionella pneumophila</i>	Zeptomatrix 0801530	1,75E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Leptospira interrogans</i>	ATCC BAA-1198D-5 (геномная ДНК)	7,89E+08 ГЭ/мл	Нет
<i>Moraxella catarrhalis</i>	ATCC 8176	5,73E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Zeptomatrix 0801660 (авирулентный штамм)	9,07E+06 КОЕ/мл	Нет
<i>Mycoplasma genitalium</i>	ATCC 33530D (геномная ДНК)	8,40E+07 ГЭ/мл	Нет
<i>Mycoplasma hominis</i>	Zeptomatrix 0804011	2,11E+09 ЕИЦ/мл	Нет
<i>Mycoplasma orale</i>	ATCC 19524	1,00E+07 ЕИЦ/мл	Нет
<i>Neisseria elongata</i>	Zeptomatrix 0801510	1,99E+08 КОЕ/мл	Нет
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 19424	2,31E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13090	1,99E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 12453	5,60E+09 КОЕ/мл	Нет

Микроорганизм	Идентификатор изолята	Тестируемая концентрация	Обнаруженная/прогнозируемая перекрестная реактивность
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	4,33E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Serratia marcescens</i>	JMI 697	4,75E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	ATCC 10832	1,88E+08 КОЕ/мл	Нет
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 29887	4,95E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ATCC 700475	4,93E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813	5,45E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	ATCC 43078	5,70E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC BAA-341	5,20E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	5,46E+07 КОЕ/мл	Нет
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 13419	4,92E+09 КОЕ/мл	Нет
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	ATCC 27618	1,00E+08 ЕИЦ/мл	Нет
Грибы			
<i>Aspergillus flavus</i>	Zeptomatrix 0801598	1,15E+08 КОЕ/мл	Нет
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Zeptomatrix 0801716	5,47E+07 КОЕ/мл	Нет
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	ATCC 26199D-2 (геномная ДНК)	7,05E+07 ГЭ/мл	Нет
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	1,19E+06 КОЕ/мл	Нет
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC MYA-4564	6,00E+07 КОЕ/мл	Нет
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Оценивалось <i>in silico</i>		Нет
<i>Pneumocystis jirovecii</i> (carinii)	ATCC PRA-159	6,67E+07 ядер/мл	Нет
Вирусы (коронавирусы, родственные SARS-CoV-2)			
SARS-подобный коронавирус летучей мыши (рекомбинантный)	BEI NR-44009	3,15E+06 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
SARS-подобный коронавирус летучей мыши HKU5 (рекомбинантный)	BEI NR-48814	1,95E+06 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS)	BEI NR-18925 Штамм Урбани	5,3E+09 копий/мл	Нет
Вирусы			
Бокавирус	Клинический образец	1,40E+08 копий/мл	Нет
Цитомегаловирус (CMV)	Zeptomatrix 0810003CF	7,67E+06 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Вирус Эпштейна-Барр (EBV)	Zeptomatrix 0810008CF	3,65E+07 копий/мл	Нет
Вирус простого герпеса 1-го типа (HSV1)	ATCC VR-1778	3,30E+08 копий/мл	Нет
Вирус простого герпеса 2-го типа (HSV2)	Zeptomatrix 0810217CF	1,30E+07 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Вирус герпеса человека 6 (HHV6)	Zeptomatrix 0810072CF	4,11E+08 копий/мл	Нет
Парвовирус человека (HPeV)	Zeptomatrix 0810147CF	2,26E+07 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Грипп С	Оценивалось <i>in silico</i>		Нет
Вирус кори	Zeptomatrix 0810025CF	1,63E+05 ТЦД ₅₀ /мл	Нет
Свинка	Zeptomatrix 0810079CF	4,83E+05 единиц/мл	Нет

Воспроизводимость

Тестирование воспроизводимости искусственных образцов проводилось в трех центрах на сочетании систем BioFire FilmArray 2.0 и BioFire FilmArray Torch. Отрицательные данные для всех аналитов были получены от одного или нескольких образцов без добавок, прошедших тестирование с использованием BioFire RP2.1*plus*. Положительные данные были собраны из образцов, содержащих подмножество репрезентативных микроорганизмов (РНК-вирусы, ДНК-вирус и бактерии), добавленные в концентрациях «Слабоположительная» (1x LoD) и «Умеренно положительная» (3x LoD), тестируемых с использованием BioFire RP2.1*plus* или FilmArray RP2*plus*. Тестирование включало диапазон возможных вариаций, представленных центром, оператором (как минимум два на центр), системой, прибором/модулем (как минимум три на центр/систему) и партией набора (три). Замороженные образцы повторно тестировались в течение пяти различных дней в 120 повторениях на образец (60 на систему).

Отчет по результатам (процент (%) совпадения с ожидаемыми результатами Detected (Обнаружен) или Not Detected (Не обнаружен)) для каждого аналита (по центру и системе) приведен в Таблица 40.

Таблица 40. Воспроизводимость результатов на системах FilmArray 2.0 и FilmArray Torch

Данные курсивом были получены при оценке воспроизводимости FilmArray RP2plus. Такое же количество повторностей (120) было протестировано на образец на BioFire RP2.1plus и FilmArray RP2plus, но тестирование было распределено иным образом между центрами и системами.

Аналит	Тестируемая концентрация	Ожидаемый результат	Совпадение с ожидаемым результатом								Все центры/системы [95% доверительный интервал]
			FilmArray 2.0				FilmArray Torch				
			Центр А	Центр В	Центр С	Итог системы	Центр А	Центр В	Центр С	Итог системы	
Аденовирус (NIBSC 16/324) Международный стандарт ВОЗ	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 9,0E+03 МЕ/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Слабоположительный 1× LoD 3,0E+03 МЕ/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
Коронавирус 229Е	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
Коронавирус HKU1	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
Коронавирус NL63 (BEI NR-470)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 7,5E-01 TCID ₅₀ /мл 1,6E+02 копий/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Слабоположительный 1× LoD 2,5E-01 TCID ₅₀ /мл 5,4E+01 копий/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
Коронавирус OC43 (ATCC VR-759)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 9,0E+01 TCID ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	29 из 30 (96,7%)	30 из 30 (100%)	59 из 60 (98,3%)	29 из 30 (96,7%)	–	29 из 30 (96,7%)	58 из 60 (96,7%)	117 из 120 97,5% [92,9–99,5%]
	Слабоположительный 1× LoD 3,0E+01 TCID ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	30 из 30 (100%)	27 из 30 (90,0%)	57 из 60 (95,0%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	117 из 120 97,5% [92,9–99,5%]
Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) (BEI NR-50171)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 3,9E+02 копий/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Слабоположительный 1× LoD 1,3E+02 копий/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
Коронавирус синдрома атипичной пневмонии 2 (SARS-CoV-2) (ATCC VR-1986HK)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 1,5E+03 копий/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]

Аналит	Тестируемая концентрация	Ожидаемый результат	Совпадение с ожидаемым результатом								Все центры/ системы [95% доверительный интервал]
			FilmArray 2.0				FilmArray Torch				
			Центр А	Центр В	Центр С	Итог системы	Центр А	Центр В	Центр С	Итог системы	
	Слабоположительный 1× LoD 5,0E+02 копий/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	19 из 20 (95%)	19 из 20 (95%)	58 из 60 (96,7%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	118 из 120 98,3% [94,1–99,8%]
Метапневмовирус человека (Zeptomatrix 0810161CF)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 3,0E+01 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	30 из 30 (100%)	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Слабоположительный 1× LoD 1,0E+01 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	28 из 30 (93,3%)	30 из 30 (100%)	58 из 60 (96,7%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	118 из 120 98,3% [94,1–99,8%]
Риновирус человека/ Энтеровирус Риновирус человека (Zeptomatrix 0810012CFN)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 3,0E-01 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	28 из 30 (93,3%)	30 из 30 (100%)	58 из 60 (96,7%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	118 из 120 98,3% [94,1–99,8%]
	Слабоположительный 1× LoD 1,0E-01 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	30 из 30 (100%)	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
Грипп А Н1	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
Грипп А Н1-2009 (Zeptomatrix 0810109CFN)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 1,5E+00 ТЦД ₅₀ /мл 1,0E+03 копий/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Слабоположительный 1× LoD 5,0E-01 ТЦД ₅₀ /мл 3,3E+02 копий/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
Грипп А Н3 (ATCC VR-810)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 3,0E-01 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	29 из 30 (96,7%)	30 из 30 (100%)	59 из 60 (98,3%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	119 из 120 99,2% [95,4–99,9%]
	Слабоположительный 1× LoD 1,0E-01 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	30 из 30 (100%)	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
Грипп В (Zeptomatrix 0810037CF)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 1,5E+01 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	30 из 30 (100%)	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Слабоположительный 1× LoD 5,0E+00 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	30 из 30 (100%)	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]

Аналит	Тестируемая концентрация	Ожидаемый результат	Совпадение с ожидаемым результатом								Все центры/ системы [95% доверительный интервал]
			FilmArray 2.0				FilmArray Torch				
			Центр А	Центр В	Центр С	Итог системы	Центр А	Центр В	Центр С	Итог системы	
Вирус парагриппа 1	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
Вирус парагриппа 2 (Zeptomatrix 0810015CF)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 1,5E+00 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	29 из 30 (96,7%)	30 из 30 (100%)	59 из 60 (98,3%)	30 из 30 (100%)	–	29 из 30 (96,7%)	59 из 60 (98,3%)	118 из 120 98,3% [94,1–99,8%]
	Слабоположительный 1× LoD 5,0E-01 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	30 из 30 (100%)	27 из 30 (90,0%)	57 из 60 (95,0%)	30 из 30 (100%)	–	29 из 30 (96,7%)	59 из 60 (98,3%)	116 из 120 96,7% [91,7–99,1%]
Parainfluenza rus 3 (Вирус парагриппа 3)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
Вирус парагриппа 4 (Zeptomatrix 0810060CF)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 1,5E+02 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	30 из 30 (100%)	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Слабоположительный 1× LoD 5,0E+01 ТЦД ₅₀ /мл	Detected (Обнаружен)	–	29 из 30 (96,7%)	30 из 30 (100%)	59 из 60 (98,3%)	30 из 30 (100%)	–	29 из 30 (96,7%)	59 из 60 (98,3%)	118 из 120 98,3% [94,1–99,8%]
Респираторно-синцитиальный вирус (Zeptomatrix 0810040ACF)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 6,0E-02 ТЦД ₅₀ /мл 1,1E+02 копий/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Слабоположительный 1× LoD 2,0E-02 ТЦД ₅₀ /мл 3,6E+01 копий/мл	Detected (Обнаружен)	19 из 20 (95%)	20 из 20 (100%)	18 из 20 (90%)	57 из 60 (95%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	19 из 20 (95%)	59 из 60 (98,3%)	116 из 120 96,7% [91,7–99,1%]
Bordetella parapertussis (IS1001) (Zeptomatrix 0801461)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 1,8E+02 IS1001 копий/мл	Detected (Обнаружен)	19 из 20 (95%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	59 из 60 (98,3%)	19 из 20 (95%)	19 из 20 (95%)	20 из 20 (100%)	58 из 60 (96,7%)	117 из 120 97,5% [92,9–99,5%]
	Слабоположительный 1× LoD 6,0E+01 IS1001 копий/мл	Detected (Обнаружен)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	20 из 20 (100%)	60 из 60 (100%)	20 из 20 (100%)	19 из 20 (95%)	20 из 20 (100%)	59 из 60 (98,3%)	119 из 120 99,2% [95,4–99,9%]
Bordetella pertussis (ptxP) (Zeptomatrix 0801459)	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
	Умеренно положительный 3× LoD 3,0E+03 КОЕ/мл	Detected (Обнаружен)	–	30 из 30 (100%)	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	30 из 30 (100%)	–	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	120 из 120 100% [97,0–100,0%]
	Слабоположительный 1× LoD 1,0E+03 КОЕ/мл	Detected (Обнаружен)	–	30 из 30 (100%)	30 из 30 (100%)	60 из 60 (100%)	28 из 30 (93,3%)	–	30 из 30 (100%)	58 из 60 (96,7%)	118 из 120 98,3% [94,1–99,8%]

Аналит	Тестируемая концентрация	Ожидаемый результат	Совпадение с ожидаемым результатом								Все центры/ системы [95% доверительный интервал]
			FilmArray 2.0				FilmArray Torch				
			Центр А	Центр В	Центр С	Итог системы	Центр А	Центр В	Центр С	Итог системы	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Отрицательный (без аналита)	Not Detected (Не обнаружен)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	60 из 60 (100%)	180 из 180 (100%)	360 из 360 100% [99,0–100,0%]

Интерференция

Было оценено воздействие веществ, которые способны повлиять на результат анализа и могут присутствовать в образцах МНГ или могут быть внесены в ходе сбора и тестирования, на эффективность панели BioFire RP2.1 *plus*. Результаты от образцов, содержащих субстанцию, сравнивались с результатами от контрольных образцов без субстанции. К этим веществам относились эндогенные вещества, которые могут присутствовать в образцах на нормальном или повышенном уровне (например, кровь, слезы/муцин, геномная ДНК человека), разнообразные симбиотические или инфекционные микроорганизмы, препараты, средства для промывания и местные препараты для носа, различные тампоны и транспортные среды для сбора образцов, а также вещества, используемые для очистки, обеззараживания или дезинфекции.

Каждое вещество было добавлено в искусственные образцы, содержащие микроорганизмы, определяемые в концентрациях около 2–3×LoD. Концентрация вещества, добавленного к образцам (Таблица 41), равнялась или превышала максимально высокий ожидаемый уровень в образцах МНГ.

Не было обнаружено веществ, влияющих на работу BioFire RP2.1 *plus*. Однако было замечено, что воздействие отбеливателя на образцы перед тестированием может повреждать микроорганизмы или нуклеиновые кислоты в образцах, что ведет к неточным результатам тестирования (невозможность обнаружения аналита). Эффект отбеливателя зависел от его концентрации и/или продолжительности взаимодействия с образцом.

Таблица 41. Оценка потенциально интерферирующих веществ для образцов МНГ на FilmArray RP2.1 *plus* и BioFire RP2.1 *plus*
Субстанции, обозначенные полужирным шрифтом, были протестированы с использованием BioFire RP2.1 *plus* на образцах, содержащих SARS-CoV-2 и другие аналиты близко к LoD.

Все остальные субстанции были протестированы в исследовании интерференции FilmArray RP2.1 *plus*.

Тестируемое вещество	Тестируемая концентрация	Результат
Эндогенные вещества		
Цельная кровь человека	Объемная доля 10%	Нет интерференции
Слезь человека (мокрота)	1 тампон на мл образца	Нет интерференции
Геномная ДНК человека	20 нг/мкл	Нет интерференции
Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC)	1,0E+03 клеток/мкл	Нет интерференции
Конкурирующие микроорганизмы		
Коронавирус 229E	1,7E+04 ТЦД ₅₀ /мл	Нет интерференции
Коронавирус OC43	9,6E+05 ТЦД₅₀/мл	Нет интерференции
Аденовирус A12	8,9E+05 ТЦД ₅₀ /мл	Нет интерференции
Вирус парагриппа 3	6,6E+05 ТЦД ₅₀ /мл	Нет интерференции
<i>Bordetella pertussis</i>	5,8E+08 КОЕ/мл	Нет интерференции
Энтеровирус D68	1,6E+07 ТЦД ₅₀ /мл	Нет интерференции
Эховирус 6	1,0E+07 ТЦД ₅₀ /мл	Нет интерференции
Респираторно-синцитиальный вирус	4,2E+04 ТЦД ₅₀ /мл	Нет интерференции
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5E+07 КОЕ/мл	Нет интерференции
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,7E+07 КОЕ/мл	Нет интерференции
<i>Streptococcus salivarius</i>	2,5E+09 КОЕ/мл	Нет интерференции
<i>Haemophilus influenzae</i>	6,2E+07 КОЕ/мл	Нет интерференции
<i>Candida albicans</i>	1,0E+06 КОЕ/мл	Нет интерференции
Вирус простого герпеса 1 типа	1,6E+06 ТЦД ₅₀ /мл	Нет интерференции
Цитомегаловирус	1,2E+06 ТЦД ₅₀ /мл	Нет интерференции

Тестируемое вещество	Тестируемая концентрация	Результат
Экзогенные вещества^a		
Тобрамицин (системный антибиотик)	0,6 мг/мл	Нет интерференции
Мупицин (активный ингредиент антибактериальных мазей)	Концентрация 2%	Нет интерференции
Солевой назальный спрей с консервантами (0,65% NaCl, фенилкарбинол, бензалкония хлорид)	Объемная доля 1%	Нет интерференции
Назальный противоотечный спрей (оксиметазолин HCl 0,05%, бензалкония хлорид, фосфат)	Объемная доля 1%	Нет интерференции
Обезболивающая мазь (Vicks® VapoRub®)	Концентрация 1%	Нет интерференции
Вазелин (Vaseline®)	Концентрация 1%	Нет интерференции
Нюхательный табак	Концентрация 1%	Нет интерференции
Дезинфицирующие/чистящие средства		
Отбеливатель	Объемная доля 1% и 2% [до 1024 ч/млн хлора]	Интерференция ^b
Дезинфицирующие салфетки (хлорид аммония)	1/2 дюйма ²	Нет интерференции
Этанол	Объемная доля 7%	Нет интерференции
DNAZap (Ambion™ AM9891G & AM9892G)	Объемная доля 1%	Нет интерференции
RNaseZap (Ambion™ AM9782)	Объемная доля 1%	Нет интерференции
Материалы для сбора образцов		
Тампоны из вискозы (Coraп 168C)	Не применимо	Нет интерференции
Тампоны из флокированного нейлона (Coraп 553C)	Не применимо	Нет интерференции
Тампоны из полиэфира (Coraп 175KS01)	Не применимо	Нет интерференции
Тампоны из альгината кальция (Puritan 25-801 A 50)	Не применимо	Нет интерференции
Транспортная среда M4® (Remel)	100%	Нет интерференции
Транспортная среда M4-RT® (Remel)	100%	Нет интерференции
Транспортная среда M5® (Remel)	100%	Нет интерференции
Транспортная среда M6™ (Remel)	100%	Нет интерференции
Универсальная вирусная транспортная среда (BD)	100%	Нет интерференции
Молекулярная транспортная среда (MTM) PrimeStore®	Объемная доля 70%	Нет интерференции
Система сбора и транспортировки вирусов Sigma-Virocult™ (тампон и транспортная среда)	100%	Нет интерференции
Система сбора и доставки образцов Coraп ESwab™ (тампон и жидкая среда Эймса)	100%	Нет интерференции

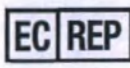
^a Интраназальные вакцины против гриппа (например, FluMist) не оценивались, однако прогнозируется, что они будут вступать в реакцию с анализами на грипп А (подтип) и грипп В.

^b После инкубации образца с 2% раствором отбеливателя на 10 минут или на ночь для некоторых анализов были получены результаты Not Detected (Не обнаружен). Сделан вывод о том, что на результаты теста повлияло главным образом повреждение микроорганизмов и нуклеиновых кислот в образце, а не влияние на функции кассеты с реагентами или их ингибирование.

ПРИМЕЧАНИЕ. Совместимость BioFire RP2.1plus с МНГ в PrimeStore® MTM не оценивалась в условиях предполагаемого использования. PrimeStore® MTM и буферный раствор BioFire FilmArray содержат соли гуанидина, которые будут реагировать с отбеливателем с образованием токсичного газа. Соблюдайте осторожность в случае использования перекиси в целях дезинфекции при сборе или тестировании образцов МНГ.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Глоссарий символов

ISO 15223-1					
Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации.					
5.1.1 	Производитель	5.1.2 	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе	5.1.4 	Использовать до (ГГГГ-ММ-ДД)
5.1.5 	Код серии (Номер партии)	5.1.6 	Номер по каталогу	5.1.7 	Серийный номер
5.2.8 	Не использовать, если упаковка повреждена	5.3.2 	Беречь от солнечного света	5.3.7 	Температурный диапазон
5.4.2 	Не использовать повторно	5.4.3 	Обратитесь к Инструкции по эксплуатации	5.5.1 	Медицинское изделие для диагностики in vitro
5.5.5 	Содержит достаточное количество для <n> тестов				
Использование символов в маркировке — 81 FR 38911, № досье (FDA-2013-N-0125)					
Rx Only	Только для использования по предписанию				
Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химических веществ (GHS) (ST/SG/AC.10/30)					
	Серьезное повреждение глаз, кат. 1		Острая токсичность, кат. 4 и раздражение кожи, кат. 2		Острая токсичность для воды, кат.1 и Хроническая токсичность для воды, кат.1
Директива Европейского Союза о медицинском оборудовании, предназначенном для диагностики in vitro (IVDD 98/79/EC) и Регламент ЕС о медицинских изделиях для диагностики in vitro (IVDR 2017/746)					
CE	Соответствует требованиям Евросоюза				
Производственные символы (BioFire Diagnostics, LLC)					
	Символ ПРИМЕЧАНИЕ объясняет, как использовать тест BioFire RP2.1plus более эффективно.				
	Набор BioFire RP2.1plus			Импортер продукта на территорию Европейского Союза	

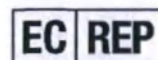
ПРИЛОЖЕНИЕ В

Контактная и юридическая информация

Пользовательская и техническая поддержка	
Найдите нас в Интернете http://www.BioFireDX.com Свяжитесь с нами по электронной почте support@BioFireDX.com Свяжитесь с нами по почте 515 Colorow Drive Salt Lake City, UT 84108 USA (США)	Свяжитесь с нами по телефону 1-800-735-6544 — бесплатный звонок (801) 736-6354 — штат Юта Свяжитесь с нами по факсу (801) 588-0507



BioFire Diagnostics, LLC
515 Colorow Drive
Salt Lake City, UT 84108
USA (США)



Qarad EC-REP BV
Pas 257
B-2440 Geel, Belgium
(Бельгия)



bioMérieux SA
376, Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile-
France (Франция)

ПРИМЕЧАНИЕ ДЛЯ ЗАКАЗЧИКОВ В ПРЕДЕЛАХ ЕВРОПЕЙСКОГО СОЮЗА (ЕС): О любом серьезном инциденте, который произошел в отношении устройства, необходимо сообщать в BioFire Diagnostics, LLC или местному торговому представителю bioMérieux и компетентному органу государства-члена ЕС, в котором находится пользователь и/или пациент.

© 2007-2020, BioFire Diagnostics, LLC. Все права защищены.

Информация, содержащаяся в данном руководстве, может изменяться без предварительного уведомления. Никакая часть настоящего документа не может быть воспроизведена или передана в любой форме или любыми средствами, электронными или механическими, для любых целей, без письменного разрешения компании BioFire Diagnostics, LLC.

ПО BioFire FilmArray, Detector и модули ПО Metacall © 2002–2020 BioFire Diagnostics, LLC.

BioFire Diagnostics, BioFire, логотип BioFire, FilmArray и LCGreen являются товарными знаками компании BioFire Diagnostics, LLC или BioFire Defense, LLC и являются зарегистрированными товарными знаками в США.

Все остальные названия изделий или марок, которые встречаются в данном руководстве, являются товарными знаками или зарегистрированными товарными знаками их соответствующих владельцев.

Приобретение этого изделия включает ограниченную, не подлежащую переуступке лицензию согласно соответствующим пунктам одного или нескольких патентов США, указанных на веб-сайте BioFire Diagnostics (<http://www.biofiredx.com/legal-notices/>) и принадлежащих BioFire и University of Utah Research Foundation.

Гарантийные обязательства

С гарантийными обязательствами по изделию можно ознакомиться в сети Интернет по адресу:

<http://www.biofiredx.com/support/documents/>

Для получения информации о гарантийных обязательствах для клиентов за пределами США свяжитесь с местным представительством компании bioMérieux или авторизованным дистрибьютором.

ПРИЛОЖЕНИЕ С

Справочные материалы

1. Jones, M. S. *et al.* New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J. Virol.* **81**, 5978–5984 (2007).
2. Lenaerts, L., De Clercq, E. & Naesens, L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev. Med. Virol.* **18**, 357–374 (2008).
3. Centers for Disease Control and Prevention. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases (DVD) Web site. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/revb/respiratory/eadfeat.htm>.
4. Calder, J. A. M. *et al.* Adenovirus type 7 genomic-type variant, New York City, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 149–152 (2004).
5. Metzgar, D. *et al.* Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *J. Infect. Dis.* **196**, 1465–1473 (2007).
6. Russell, K. L. *et al.* Transmission dynamics and prospective environmental sampling of adenovirus in a military recruit setting. *J. Infect. Dis.* **194**, 877–885 (2006).
7. Corman, V. M., Muth, D., Niemeyer, D. & Drosten, C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. in *Advances in Virus Research* vol. *Advances in Virus Research* 163–188 (Elsevier, 2018).
8. Yang, Y. *et al.* The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *J. Autoimmun.* **109**, 102434 (2020).
9. Zaki, A. M., Van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. & Fouchier, R. A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1814–1820 (2012).
10. Chan, J. F. *et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 465–522 (2015).
11. Wu, Y. *et al.* SARS-CoV-2 is an appropriate name for the new coronavirus. *The Lancet* **395**, 949–950 (2020).
12. Cucinotta, D. & Vanelli, M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Bio Medica Atenei Parm.* **91**, 157–160 (2020).
13. van der Hoek, L. *et al.* Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med.* **2**, e240 (2005).
14. Kahn, J. S. & McIntosh, K. History and recent advances in coronavirus discovery. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, S223–227, discussion S226 (2005).
15. Kuypers, J. *et al.* Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics* **119**, 70–76 (2007).
16. Yuen, K.-S., Ye, Z.-W., Fung, S.-Y., Chan, C.-P. & Jin, D.-Y. SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions. *Cell Biosci.* **10**, 40 (2020).
17. Petrosillo, N., Viceconte, G., Ergonul, O., Ippolito, G. & Petersen, E. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin. Microbiol. Infect.* S1198743X20301713 (2020) doi:10.1016/j.cmi.2020.03.026.
18. Eckerle, I., Müller, M. A., Kallies, S., Gotthardt, D. N. & Drosten, C. In-vitro renal epithelial cell infection reveals a viral kidney tropism as a potential mechanism for acute renal failure during Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus infection. *Virol J* **10**, 359 (2013).
19. Arabi, Y. M. *et al.* Clinical course and outcomes of critically ill patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Ann. Intern. Med.* **160**, 389–397 (2014).
20. Kahn, J. S. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 546–557 (2006).
21. van den Hoogen, B. G. *et al.* A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* **7**, 719–724 (2001).
22. Falsey, A. R., Erdman, D., Anderson, L. J. & Walsh, E. E. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J. Infect. Dis.* **187**, 785–790 (2003).
23. VAN DEN HOOGEN, B. G., OSTERHAUS, D. M. E. & FOUCHIER, R. A. M. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **23**, S25–S32 (2004).
24. Esper, F. *et al.* A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged < 5 years. *J. Infect. Dis.* **189**, 1388–1396 (2004).
25. World Health Organization. WHO Fact Sheet No. 221, April, 2009. Influenza (Seasonal).
26. Bammer, L., Fukuda, A., Klimov, and N. Cox. Influenza. in *VPD Surveillance Manual* (2002).
27. Update: influenza activity - United States, August 30, 2009–March 27, 2010, and composition of the 2010–11 influenza vaccine. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **59**, 423–430 (2010).
28. Bammer, L., Fukuda, A., Klimov, and N. Cox. Influenza. in *VPD Surveillance Manual* (2002).
29. Morens, D. M., Taubenberger, J. K. & Fauci, A. S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis* **198**, 962–70 (2008).
30. Henrickson, K. J. Parainfluenza viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 242–264 (2003).
31. Senchi, K., Matsunaga, S., Hasegawa, H., Kimura, H. & Ryo, A. Development of oligomannose-coated liposome-based nasal vaccine against human parainfluenza virus type 3. *Front Microbiol* **4**, 346 (2013).
32. Lau, S. K. P. *et al.* Human parainfluenza virus 4 outbreak and the role of diagnostic tests. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4515–4521 (2005).

33. Fry, A. M. *et al.* Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990–2004. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1016–1022 (2006).
34. Mohapatra, S. S. & Boyapalle, S. Epidemiologic, experimental, and clinical links between respiratory syncytial virus infection and asthma. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 495–504 (2008).
35. Anderson, L. J., Hendry, R. M., Pierik, L. T., Tsou, C. & McIntosh, K. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* **163**, 687–692 (1991).
36. Falsey, A. R. & Walsh, E. E. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 371–384 (2000).
37. Hall, C. B. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1917–1928 (2001).
38. Anzueto, A. & Niederman, M. S. Diagnosis and treatment of rhinovirus respiratory infections. *Chest* **123**, 1664–1672 (2003).
39. Jacques, J. *et al.* Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 206–213 (2008).
40. Jacobs, S. E., Lamson, D. M., George, K. S. & Walsh, T. J. Human rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 135–162 (2013).
41. Sawyer, M. H. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Pediatr.* **13**, 65–69 (2001).
42. Centers for Disease Control and Prevention. Centers for Disease Control and Prevention, Pertussis (Whooping Cough) Web Site.
43. World Health Organization. WHO Immunization, Vaccines, and Biologics; Pertussis Web Site.
44. Mattoo, S. & Cherry, J. D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 326–382 (2005).
45. Srugo, I. *et al.* Pertussis infection in fully vaccinated children in day-care centers, Israel. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 526–529 (2000).
46. Hahn, D. L., Azenabor, A. A., Beatty, W. L. & Byrne, G. I. Chlamydia pneumoniae as a respiratory pathogen. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **7**, e66–76 (2002).
47. Grayston, J. T. Chlamydia pneumoniae, strain TWAR pneumonia. *Annu. Rev. Med.* **43**, 317–323 (1992).
48. Kuo, C. C., Jackson, L. A., Campbell, L. A. & Grayston, J. T. Chlamydia pneumoniae (TWAR). *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 451–461 (1995).
49. Peeling, R. W. & Brunham, R. C. Chlamydiae as pathogens: new species and new issues. *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 307–319 (1996).
50. Outbreak of community-acquired pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae*—Colorado, 2000. *Can. Commun. Dis. Rep. Relevé Mal. Transm. Au Can.* **27**, 104–107 (2001).
51. Klement, E. *et al.* Identification of risk factors for infection in an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **43**, 1239–1245 (2006).
52. Centers for Disease Control and Prevention. Centers for Disease Control and Prevention, Disease Listing: *Mycoplasma pneumoniae* Web Site.
53. Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; NCCLS Approved Guideline. (2006).
54. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; NCCLS Approved Guideline. (2008).

ПРИЛОЖЕНИЕ D.

Приложение к инструкции по применению медицинского изделия для пользователей на территории Российской Федерации

Описание медицинского изделия для in vitro диагностики

1. Наименование медицинского изделия:

«Набор реагентов BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus) для обнаружения и идентификации нуклеиновых кислот возбудителей респираторных инфекций в образцах носоглоточных мазков методом мультиплексной ПЦР на системах семейства FilmArray, в составе:

1. Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus - 30 шт.
2. Раствор буферный - 1,0 мл × 32 шт. (ампула)
3. Раствор регидратирующий - 1,5 мл × 32 шт. (флакон с канюлей)
4. Флакон с канюлей для внесения образца - 32 шт.
5. Пипетка - 32 шт.

Варианты сокращенного наименования набора реагентов, которые используются в маркировке компонентов набора реагентов: *BioFire Respiratory Panel 2.1 plus*, *BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus)*, *BioFire RP2.1plus**, *RP2.1plus*.

**RP2.1plus это сокращение от Respiratory Panel 2.1 plus*

(Далее по тексту набор реагентов *BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus)*, кассета с реагентами *BioFire RP2.1plus*, набор реагентов, набор реагентов *BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2plus)*, набор *RP2.1plus*, кассета *RP2.1plus*)

2. Область применения и требования к оператору (пользователю)

Клиническая лабораторная диагностика.

Только для диагностики in vitro.

Медицинское изделие BioFire RP2.1plus должно использоваться обученным медицинскими работниками и лаборантами в лабораторных условиях или под наблюдением обученного лаборанта.

3. Показания

BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus) представляет собой выполняемый по методу амплификации нуклеиновых кислот мультиплексный тест, предназначенный для использования с системами семейства FilmArray производства BioFire (по тексту BioFire FilmArray) для одновременного качественного обнаружения и идентификации нескольких респираторных вирусных и бактериальных нуклеиновых кислот в мазках из носоглотки (МНГ) лиц, подозреваемых в наличии инфекций дыхательных путей, включая COVID-19.

BioFire RP2.1plus позволяет идентифицировать следующие типы и подтипы микроорганизмов.

Вирусы:

- Adenovirus (Аденовирус)
- Coronavirus 229E (Коронавирус 229E)
- Coronavirus HKU1 (Коронавирус HKU1)
- Coronavirus NL63 (Коронавирус NL63)
- Coronavirus OC43 (Коронавирус OC43)
- Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) (Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV))
- Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2))
- Human Metapneumovirus (Метапневмовирус человека)
- Human Rhinovirus/Enterovirus (Риновирус/энтеровирус человека)
- Influenza A (Грипп А), включая подтипы H1, H3 и H1-2009
- Influenza B (Грипп В)
- Parainfluenza Virus 1 (Вирус парагриппа 1)

- *Parainfluenza Virus 2* (Вирус парагриппа 2)
- *Parainfluenza Virus 3* (Вирус парагриппа 3)
- *Parainfluenza Virus 4* (Вирус парагриппа 4)
- *Respiratory Syncytial Virus* (Респираторно-синцитиальный вирус)

Бактерии:

- *Bordetella parapertussis*
- *Bordetella pertussis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*

Нуклеиновые кислоты от респираторных вирусов и бактерий, идентифицируемые этим тестом, обычно обнаруживаются в образцах МНГ в течение острой фазы инфекции. Обнаружение и идентификация конкретных вирусных и бактериальных нуклеиновых кислот у лиц с признаками и/или симптомами респираторной инфекции указывают на наличие идентифицированного микроорганизма и помогают, если их использовать в сочетании с другой клинической и эпидемиологической информацией, диагностировать респираторные инфекции. Результаты этого теста не следует использовать в качестве единственной основы для диагностики, лечения и принятия других решений касательно пациента.

Отрицательные результаты в контексте респираторного заболевания могут быть обусловлены инфицированием патогенными микроорганизмами, которое не обнаруживает этот тест, или инфекцией нижних дыхательных путей, которая может быть не обнаружена образцами мазков из носоглотки. Положительные результаты не исключают сопутствующую инфекцию, вызванную другими микроорганизмами. Обнаруженный(-ые) BioFire RP2.1plus возбудитель(-и) может (могут) не являться точной причиной заболевания. При оценке пациента с возможной инфекцией дыхательных путей может потребоваться дополнительное лабораторное тестирование (например, бактериальные и вирусные культуры, иммунофлюоресценция и рентгенография).

4. Противопоказания

Не применимо к данному медицинскому изделию.

5. Возможные побочные эффекты при использовании медицинского изделия

Не применимо к данному медицинскому изделию.

6. Общее описание изделия. Состав.

«Набор реагентов BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus) для обнаружения и идентификации нуклеиновых кислот возбудителей респираторных инфекций в образцах носоглоточных мазков методом мультиплексной ПЦР на системах семейства FilmArray, в составе:

1. Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus - 30 шт.
2. Раствор буферный - 1,0 мл × 32 шт. (ампула)
3. Раствор регидратирующий - 1,5 мл × 32 шт. (флакон с канюлей)
4. Флакон с канюлей для внесения образца - 32 шт.
5. Пипетка - 32 шт.»

7. Описание или полный список различных конфигураций/исполнений медицинского изделия для диагностики in vitro

Медицинское изделие выпускается в одном варианте исполнения. Другие варианты исполнения не заявлены.

Набор реагентов BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus) для обнаружения и идентификации нуклеиновых кислот возбудителей респираторных инфекций в образцах носоглоточных мазков методом мультиплексной ПЦР на системах семейства FilmArray, в составе:

1. Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus - 30 шт.
2. Раствор буферный - 1,0 мл × 32 шт. (ампула)
3. Раствор регидратирующий - 1,5 мл × 32 шт. (флакон с канюлей)
4. Флакон с канюлей для внесения образца - 32 шт.
5. Пипетка - 32 шт.

Сопроводительная информация производителя к изделию

1. Комплект поставки

В комплект поставки входит:

Набор реагентов BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus) для обнаружения и идентификации нуклеиновых кислот возбудителей респираторных инфекций в образцах носоглоточных мазков методом мультиплексной ПЦР на системах семейства FilmArray, в составе:

1. Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus - 30 шт.
2. Раствор буферный - 1,0 мл × 32 шт. (ампула)
3. Раствор регидратирующий - 1,5 мл × 32 шт. (флакон с канюлей)
4. Флакон с канюлей для внесения образца - 32 шт.
5. Пипетка - 32 шт.

2. Описание упаковки

Вторичная упаковка:

Внешняя картонная коробка (с этикеткой)

Первичная упаковка:

1. Маркированный запечатанный пакет из миларовой пленки, в котором находится металлический тубус
2. В каждом металлическом тубусе находится 1 кассета набора реагентов BioFire RP2.1plus.
3. Маркированный пакет из полиэтиленовой пленки с замком, в котором находятся одноразовые пластмассовые ампулы из полиэтилена низкой плотности с раствором буферным (в каждой ампуле содержится 1 мл раствора буферного).
4. Маркированный пакет из полиэтиленовой пленки с замком, в котором находятся одноразовые полипропиленовые флаконы с канюлей с раствором регидратирующим. В каждом флаконе содержится 1,5 мл раствора регидратирующего. Флакон с крышкой синего цвета.
5. Маркированный пакет из полиэтиленовой пленки с замком, в котором находятся одноразовые пластиковые полипропиленовые флаконы с канюлей для внесения образца. Флакон с крышкой красного цвета.
6. Маркированный пакет из полиэтиленовой пленки с замком, в котором находятся полиэтиленовые пипетки в индивидуальной упаковке.

Размеры набора реагентов и его компонентов

Описание	Габариты
Коробка набора	35,6 см ± 10% 33,0 см ± 10% 25,4 см ± 10% Масса: 2,5 кг ± 10%
Металлический тубус, содержащий кассету набора реагентов BioFire RP2.1plus	Высота: 14,0 см ± 0,3 см Диаметр: 5,0 см ± 0,3 см
Раствор буферный - 1,0 мл (ампула)	Длина: 7,30 см ± 0,3 см Объем: 1 мл ± 0,03 мл
Раствор регидратирующий - 1,5 мл (флакон с канюлей)	Высота: 7,15 см ± 0,3 см Объем: 1,5 мл ± 0,1 мл Канюля: Длина: 22,733 мм ± 0,635 мм
Флакон с канюлей для внесения образца	Высота: 7,15 см ± 0,3 см Объем: 1,5 мл ± 0,1 мл Канюля: Длина: 22,733 мм ± 0,635 мм
Пипетка	Длина: 11,6 см ± 0,3 см

	Объем: 1,5 мл $\pm$ 0,1 мл
Кассета с реагентами BioFire RP2.1plus	8,00 см $\pm$ 0,3 см 12,40 см $\pm$ 0,3 см 2,55 см $\pm$ 0,3 см

3. Маркировка

Маркировка внешней упаковки:

Информация по групповой упаковке медицинского изделия: Транспортировка изделия осуществляется во вторичной упаковке.

II. Этикетки на первичной упаковке

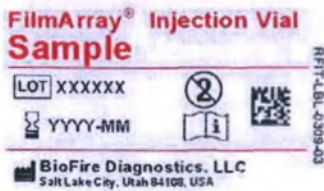
Описание	Макет этикетки	Перевод										
Этикетка индивидуальной упаковки из миларовой пленки		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению <table><tr><td>BioFire Respiratory Panel 2.1 plus</td><td>Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus</td></tr></table>	BioFire Respiratory Panel 2.1 plus	Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus								
BioFire Respiratory Panel 2.1 plus	Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus											
Этикетка крепежа кассеты с реагентами BioFire RP2.1 plus		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>BioFire RP2.1 plus</td><td>Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus</td></tr><tr><td>Sample ID here or reverse side</td><td>Укажите ID образца здесь или на оборотной стороне</td></tr><tr><td>Pull</td><td>Потянуть</td></tr><tr><td>Sample mix</td><td>Смесь образца</td></tr><tr><td>Hydratation solution</td><td>Раствор регидратирующий</td></tr></table>	BioFire RP2.1 plus	Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus	Sample ID here or reverse side	Укажите ID образца здесь или на оборотной стороне	Pull	Потянуть	Sample mix	Смесь образца	Hydratation solution	Раствор регидратирующий
BioFire RP2.1 plus	Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus											
Sample ID here or reverse side	Укажите ID образца здесь или на оборотной стороне											
Pull	Потянуть											
Sample mix	Смесь образца											
Hydratation solution	Раствор регидратирующий											

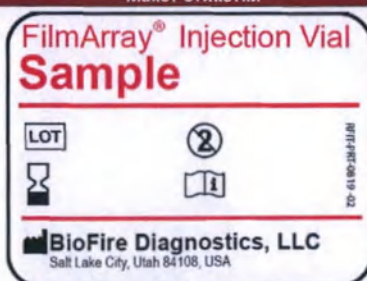
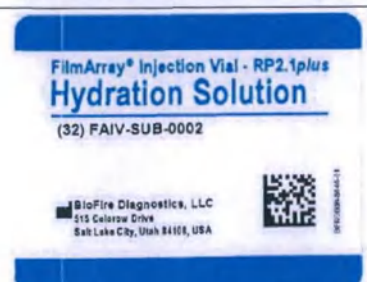
Этикетка
групповой
упаковки
Раствора
буферного

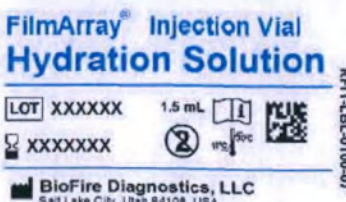
Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению.

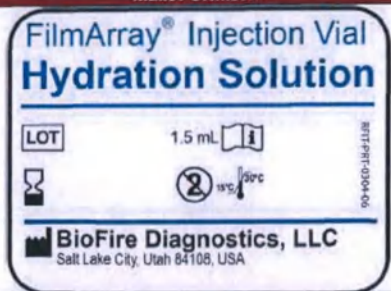
FilmArray Sample buffer	Раствор буферный
Avoid release to the environment	Избегать попадания в окружающую среду
Wear protective gloves, clothing, eye and face protection.	Носить защитные перчатки, одежду, защиту для глаз и лица.
IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промыть водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если они имеются, и это легко сделать. Продолжайте промывать.
IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.	В случае проглатывания: позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу, если вы плохо себя чувствуете.
DANGER Harmful if swallowed, causes skin irritation and serious eye damage. Harmful to aquatic life with long lasting effects.	ОПАСНОСТЬ Вреден при проглатывании, вызывает раздражение кожи и серьезное повреждение глаз. Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.
The full label information for the contents is provided on this label, do not store contents of this bag separately	Полная информация для содержимого предоставлена на этой этикетке, не храните содержимое этой упаковки отдельно

Описание	Макет этикетки	Перевод				
Этикетка индивидуальной упаковки раствора буферного		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>FilmArray Sample buffer</td><td>Раствор буферный</td></tr><tr><td>Danger</td><td>Опасно</td></tr></table>	FilmArray Sample buffer	Раствор буферный	Danger	Опасно
FilmArray Sample buffer	Раствор буферный					
Danger	Опасно					
Этикетка групповой упаковки флаконов с канюлей для внесения образца (при ручной стикерровке)		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>FilmArray Injection vial - RP2.1 plus Sample</td><td>FilmArray Injection vial - RP2.1 plus Sample</td></tr></table>	FilmArray Injection vial - RP2.1 plus Sample	FilmArray Injection vial - RP2.1 plus Sample		
FilmArray Injection vial - RP2.1 plus Sample	FilmArray Injection vial - RP2.1 plus Sample					

Описание	Макет этикетки	Перевод		
Этикетка групповой упаковки флаконов с канюлей для внесения образца (при автоматической стикеровке)		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>FilmArray Injection Vial – Sample</td><td>Флакон с канюлей для внесения образца</td></tr></table>	FilmArray Injection Vial – Sample	Флакон с канюлей для внесения образца
FilmArray Injection Vial – Sample	Флакон с канюлей для внесения образца			
Этикетка флакона с канюлей для внесения образца (при ручной стикеровке)		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>FilmArray Injection Vial – Sample</td><td>Флакон с канюлей для внесения образца</td></tr></table>	FilmArray Injection Vial – Sample	Флакон с канюлей для внесения образца
FilmArray Injection Vial – Sample	Флакон с канюлей для внесения образца			

Описание	Макет этикетки	Перевод		
Этикетка флакона с канюлей для внесения образца (при автоматической стикеровке)		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>FilmArray Injection vial Sample</td><td>Флакон с канюлей для внесения образца</td></tr></table>	FilmArray Injection vial Sample	Флакон с канюлей для внесения образца
FilmArray Injection vial Sample	Флакон с канюлей для внесения образца			
Этикетка групповой упаковки Раствора регидратирующего (при ручной стикеровке)		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>FilmArray Injection vial – RP2.1 plus Hydration Solution</td><td>Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)</td></tr></table>	FilmArray Injection vial – RP2.1 plus Hydration Solution	Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)
FilmArray Injection vial – RP2.1 plus Hydration Solution	Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)			

Описание	Макет этикетки	Перевод		
Этикетка групповой упаковки Раствора регидратирующего (при автоматической стикеровке)		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>FilmArray Injection vial – RP2.1 plus Hydration Solution</td><td>Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)</td></tr></table>	FilmArray Injection vial – RP2.1 plus Hydration Solution	Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)
FilmArray Injection vial – RP2.1 plus Hydration Solution	Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)			
Этикетка индивидуальной упаковки раствора регидратирующего (при ручной стикеровке)		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>FilmArray Injection vial Hydration Solution</td><td>Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)</td></tr></table>	FilmArray Injection vial Hydration Solution	Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)
FilmArray Injection vial Hydration Solution	Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)			

Описание	Макет этикетки	Перевод		
Этикетка индивидуальной упаковки раствора регидратирующего (при автоматической стикеровке)		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>FilmArray Injection vial Hydration Solution</td><td>Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)</td></tr></table>	FilmArray Injection vial Hydration Solution	Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)
FilmArray Injection vial Hydration Solution	Раствор регидратирующий (флакон с канюлей)			
Этикетка упаковки пипеток		Значения символов приведены в глоссарии символов в приложении А инструкции по применению. <table><tr><td>FilmArray Transfer Pipettes</td><td>Пипетка</td></tr></table>	FilmArray Transfer Pipettes	Пипетка
FilmArray Transfer Pipettes	Пипетка			

III. Макет маркировки на русском языке

REF 423740

RU

Производитель:
«БиоФаер Диагностика, ЛПС»
США

«Набор реагентов BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus)» для обнаружения и идентификации нуклеиновых кислот возбудителей респираторных инфекций в образцах носоглоточных мазков методом мультиплексной ПЦР на системах семейства FilmArray

1. Кассета с реагентами BioFire RP2.1 plus – 30 шт.

2. Раствор буферный – 1,0 мл × 32 шт. (ампула)

3. Раствор регидратирующий – 1,5 мл × 32 шт. (флакон с канюлей)

4. Флакон с канюлей для внесения образца – 32 шт.

5. Пипетка – 32 шт.

Уполномоченный представитель в
РФ: ООО «биоМерье Рус»

Адрес:

Россия, 1 15230, Москва,

1-ый Нагатинский проезд, д. 10, стр.

1 Тел./факс: + 7 (495) 221 10 79

РУ <указывается номер и дата

регистрационного удостоверения>

Дополнение к разделу "Предупреждения и меры предосторожности"

Маркировка в соответствии с Положением (ЕС) № 1272/2008 с поправками

Содержит: Хлорид гуанидиния, Поверхностно-активное вещество Тритон X-100



Символы опасности

Сигнальное слово	Опасно
Краткая характеристика опасности	
H400	Чрезвычайно токсично для водных организмов.
H410	Чрезвычайно токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями.
H302	Опасно при проглатывании.
H315	Вызывает раздражение кожи.
H318	Вызывает серьезное повреждение глаз.
Информация о мерах предосторожности	
Предотвращение	
P260	Вдыхать пар запрещено.
P273	Следует избегать попадания в окружающую среду.
P280	Следует пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица.
Реакция на воздействие	
P391	Собрать пролитый продукт.
P332 + P313	При раздражении кожи: обратиться за медицинской помощью.
P305 + P351 + P338	ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если они есть и если это легко сделать. Продолжить промывание.
P301 + P312	ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: при плохом самочувствии следует обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР/к врачу.
P337 + P313	Если раздражение глаз не проходит: обратиться за медицинской помощью.
Хранение	Данные отсутствуют.
Утилизация	Отходы и остатки следует утилизировать в соответствии с требованиями местных властей.
Дополнительная информация к этикетке	15% смеси состоит из компонентов с неизвестной острой пероральной токсичностью. 70% смеси состоит из компонентов с неизвестной острой дермальной токсичностью. 70% смеси состоит из компонентов с неизвестной острой ингаляционной токсичностью.
Прочие опасности	Данная смесь не соответствует критериям vPvB/PBT Регламента (ЕС) № 1907/2006, Приложение XIII.

Дополнение к разделу "Стабильность реагентов (установленный срок годности, стабильность после вскрытия, при транспортировании)".

Срок годности, подтвержденный в режиме реального времени, составляет 12 месяцев.

Перечень применяемых стандартов

В настоящем разделе представлен список гармонизированных и признанных стандартов, которым следует компания «БиоФаер Диагностика», применительно к наборам реагентов BioFire RP2.1plus. Указанные ниже стандарты отнесены к общим стандартам, стандартам, требования которых были выполнены при оценке рабочих характеристик, а также стандартам, требования которых были выполнены при маркировке наборов реагентов BioFire RP2.1plus.

Общие

EN ISO 13485:2016, «Изделия медицинские – Система менеджмента качества – Требования для целей нормативного регулирования»

EN 13641:2002, «Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики in vitro»

EN ISO 14971:2012, «Изделия медицинские – Применение менеджмента риска к медицинским изделиям»

EN 62366:2008, «Изделия медицинские – Проектирование медицинских изделий с учетом эксплуатационной пригодности»

Оценка рабочих характеристик

EN 13612:2002, «Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro»

EN ISO 23640:2015, «Изделия медицинские для диагностики in vitro - Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro»

Маркировка

EN ISO 15223-1:2016, «Изделия медицинские - Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации - Часть 1: Общие требования»

EN ISO 18113-1:2011 «Изделия медицинские для диагностики in vitro - Информация, предоставляемая производителем (этикетирование) - Часть 1: Термины, определения и общие требования»

EN ISO 18113-2:2011 «Изделия медицинские для диагностики in vitro - Информация, предоставляемая производителем (этикетирование) - Часть 2: Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения».

Компания «БиоФаер Диагностика» следует требованиям Регламента ЕС № 1272/2008, регламентом REACH (ЕС 1907/2006) применительно к наборам реагентов BioFire RP2.1plus.

Физико – химические свойства

Наименование	Описание
Кассеты с реагентами BioFire RP2.1plus	Твердый. Кассета с реагентами: жесткий каркас кассеты из пластмассы (полиэтилена) белого цвета, комбинированный с гибкой прозрачной пластиковой пленкой, разделенной на отдельные сегменты (блистеры).
Раствор буферный - 1,0 мл × 32 шт. (ампула)	Жидкость, прозрачная, бесцветная
Флакон с канюлей для внесения образца – 32 шт	Твердый, пустой флакон из полипропилена низкой плотности, канюля из нержавеющей стали
Раствор регидратирующий – 1,5 мл × 32 шт. (флакон с канюлей)	Жидкость, прозрачная, бесцветная, вода молекулярной степени чистоты
Пипетки - 32 шт.	Твердый. Пипетка из полиэтилена низкой плотности

Условия транспортировки

Перед отправкой с завода продукт проходит контрольные проверки. Международные символы на упаковке и специальные инструкции по обращению указывают транспортировщику, как следует обращаться с этим продуктом. При получении продукта внимательно осмотрите упаковку. При наличии любых следов неправильного обращения или повреждения немедленно обратитесь в отдел обслуживания клиентов компании «БиоФаер Диагностикс, ЛЛС» или к уполномоченному производителю.

Транспортировка набора реагентов может осуществляться всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта, с соблюдением условий хранения*.

Материалы и упаковка обеспечивают возможность использования реагентов после транспортировки и хранения в соответствии с рекомендациями, представленными в инструкции по применению.

*Условия транспортировки набора реагентов: 15–25 °C и влажности от 20% до 80%, НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ.

Анализ и управление рисками

Деятельность по анализу и управлению рисками является неотъемлемой частью всего жизненного цикла изделия, начиная с предложения проекта и в период наблюдения после регистрации.

Защита окружающей среды

Во время работы и хранения набор реагентов не оказывает отрицательного влияния на пациента, медицинских работников и на окружающую среду при соблюдении правил, описанных в инструкции по применению набора реагентов.

Меры защиты окружающей среды: Соблюдайте правила по работе и утилизации.

Стерилизация

Изделие поставляется нестерильным. Не подлежит повторному использованию и/или стерилизации пользователем.

Данное изделие не имеет статуса стерильного и не подлежит стерилизации. Строгий контроль производственного процесса и процесса упаковки гарантирует, что микробная контаминация или контаминация ампликонами не будет являться факторов, влияющим на рабочие характеристики изделия.

Техническое обслуживание и ремонт

Не применимо. Только для однократного использования. Не используйте, если повреждено.

Утилизация

Утилизация отходов

Утилизируйте использованные в данном анализе материалы, включая реагенты, образцы и использованные флаконы, в соответствии с принятыми федеральными, государственными или локальными нормативными документами.

Утилизируйте использованные и неиспользованные реагенты, а также любые другие контаминированные одноразовые материалы в соответствии с правилами утилизации инфицированных или потенциально инфицированных продуктов.

Сотрудники лаборатории несут ответственность за обращение и утилизацию образующихся отходов и сточных вод в соответствии с их типом и степенью опасности (или организацию их обработки и утилизации), согласно всем применимым нормам и правилам.

Утилизация продуктов осуществляется организацией, которая имеет соответствующую лицензию, на специально оборудованных участках, полигонах и в зданиях, в соответствии с требованиями действующего федерального законодательства и в соответствии с обязательными требованиями по защите окружающей среды.

Методы утилизации отходов

Рекомендации:

Химические вещества необходимо утилизировать в соответствии с действующими национальными регламентирующими документами.

Загрязненная упаковка

Рекомендации:

Утилизация отходов должна осуществляться в соответствии с требованиями местных нормативных документов. Упаковка, которая не может быть очищена, подлежит утилизации таким же способом, что и сам продукт.

Рекомендованные чистящие средства:

Вода, при необходимости, в сочетании с неокисляющими чистящими средствами. Не допускается использование гипохлорита натрия (отбеливателя).

Гарантии изготовителя

Гарантия действительна в течение всего периода до даты истечения срока годности, при условии соблюдения рекомендаций по транспортировке, хранению и эксплуатации, указанных на наружной маркировке набора реагентов и в инструкции по применению.

С гарантийными обязательствами по изделию можно ознакомиться в сети Интернет по адресу: <http://www.biofiredx.com/support/documents/> Для получения информации о гарантийных обязательствах для клиентов за пределами США свяжитесь с местным представительством компании bioMérieux или авторизованным дистрибьютором.

Перед возвратом любого продукта, пожалуйста, обратитесь к приведенным ниже инструкциям, и свяжитесь службой технической поддержки компании "БиоФаер Диагностика ЛЛС" (далее по тексту "BFDX"): по телефону (800) 735-6544, (801) 736-6354 или по электронной почте support@biofiredx.com. КЛИЕНТ СОГЛАШАЕТСЯ НА ВСЕ УСЛОВИЯ И ОБЯЗАТЕЛЬСТВА, СОДЕРЖАЩИЕСЯ В НАСТОЯЩЕЙ СТАНДАРТНОЙ ОГРАНИЧЕННОЙ ГАРАНТИИ.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЯ.

Термин "Кассета с реагентами" означает клинко-диагностические олигонуклеотидные пробы или праймеры процесса циклического изменения температуры, зонды или реагенты производства BFDX. Термин "Анализатор(ы)" означает анализаторы BioFire RP2.1plus, которые изготовлены и/или распространяются компанией BFDX или через сторонние компании, одобренные компанией BFDX. Термин "Программное обеспечение" означает программное обеспечение, разработанное и распространяемое компанией BFDX. Термин "Программное обеспечение сторонней компании" означает программное обеспечение, разработанное, продаваемое или зарегистрированное сторонней компанией, а не компанией BFDX. Термин "Продукты сторонней компании" означает любую кассету с реагентами, анализатор или вспомогательный продукт, используемые с анализаторами, которые изготовлены не компанией BFDX. Термин "Продукт" означает кассету с реагентами, анализатор или детали, или компоненты, и/или программное обеспечение, изготовленные компанией BFDX. Термин "Спецификации" означает критерии, установленные компанией BFDX в руководстве пользователя, для измерения, расчета или оценки работы или рабочих характеристик соответствующего продукта с учетом любых обновлений или изменений, внесенных компанией BFDX после получения продукта клиентом.

2. УСЛОВИЯ ГАРАНТИИ.

Эта ограниченная гарантия начинает действовать, когда компания BFDX предоставляет продукцию перевозчику/грузоотправителю для доставки клиенту. Гарантия действует с этой даты в течение двенадцати (12) месяцев. Клиент может приобрести расширенную гарантию от компании BFDX, которая будет обеспечивать охват продуктов после истечения этого первоначального двенадцатимесячного (12) периода. Ремонт и замена анализаторов покрываются данной стандартной ограниченной гарантией в течение (i) девяноста (90) дней после даты ремонта или замены, или (ii) остального первичного периода гарантии, в зависимости от того, что дольше.

3. ОБЛАСТЬ ДЕЙСТВИЯ.

В соответствии с условиями данного документа, компания BFDX гарантирует, что:

(i) Анализаторы фактически будут свободными от дефектов в материалах и качестве работы, и будут функционировать в соответствии с описанием, представленным в разделе "Спецификации" руководства пользователя, предоставляемого компанией BFDX;

(ii) Правильно установленное и действующее программное обеспечение будет работать в основном в соответствии со спецификациями при использовании с анализатором, продаваемым компанией BFDX или сторонней компанией, одобренной компанией BFDX;

(iii) Кассеты с реагентами не будут иметь никаких дефектов материала и качества, и при правильном хранении и обслуживании в соответствии с руководством пользователя будут пригодны для использования в течение периода не менее срока, указанного на этикетке.

Первоначальный конечный пользователь («Вы», «Ваш» или «Клиент») – это лицо, которое имеет права в рамках данной ограниченной гарантии. Права и обязанности клиента будут установлены и действовать в интересах соответствующих преемников клиента, наследников, исполнителей, администраторов и правопреемников.

4. ИСКЛЮЧЕНИЯ ГАРАНТИИ.

Данная ограниченная гарантия исключает: (i) ремонтные работы или другие услуги, которые являются необходимыми по причине использования, не в соответствии с руководством пользователя; (ii) нормальный износ, кроме эксплуатационной или механической поломки; и (iii) деконтаминацию анализатора; (iv) кражу или другие случаи потери; (v) повреждения, которые не влияют на функциональность; (vi) проблемы, вытекающие из или связанные с неправильным использованием, изменением, отсутствием обслуживания, аварией, или неосторожным, чрезмерным, умышленным или преднамеренным обращением; и (vii) проблемы, возникающие вследствие или связанные с внешними источниками электрической энергии; (viii) неправильное обслуживание, ремонт или демонтаж (в том числе, частичную разборку) кем-либо, за исключением сотрудников компании BFDX или уполномоченных ей представителей, или использование деталей, принадлежностей или расходных материалов, не предусмотренных компанией BFDX; (ix) проблемы, возникающие в связи с или относящиеся к программному обеспечению, установленному на любом устройстве, кроме устройства, которое продается компанией BFDX или через сторонние компании, одобренные компанией BFDX; (x) анализаторы, устройства, расходные материалы или принадлежности, изготовленные любой компанией, кроме компании BFDX, в том числе наборы реагентов, центрифуги, компьютеры, мониторы, принтеры или другие периферийные устройства или системы, и программное обеспечение сторонних компаний, в том числе операционную систему устройства или приложения (помимо программного обеспечения); и (xi) любые расходы на дополнительное оборудование, запасные части или принадлежности, связанные с обновлением программного обеспечения или новой версией программного обеспечения.

5. ПРЕИМУЩЕСТВА ОГРАНИЧЕННОЙ ГАРАНТИИ.

Данная ограниченная гарантия дает клиенту следующие преимущества:

Утеря или повреждение во время транспортировки:

В случае утери или повреждения продуктов во время транспортировки грузоперевозчиком, компания BFDX заменит продукты после уведомления от клиента, инициирующего претензию, как это предусмотрено в Разделе 7 ниже;

Ремонт анализатора:

Компания BFDX предоставляет рабочую силу, детали и/или заменяющее оборудование, необходимые для ремонта эксплуатационных или механических повреждений анализатора, как это предусмотрено в Разделе 3 выше;

Обновления программного обеспечения:

Компания BFDX будет предоставлять новые версии, выпуски или обновления программного обеспечения, как это предусмотрено в Разделе 3 выше, при условии, что компания BFDX может потребовать от клиента установки и использования обновления программного обеспечения в качестве условия, предшествующего продолжению обслуживания в рамках этой ограниченной гарантии;

Необязательная калибровка анализатора и контроль качества:

Не более одного (1) раза в течение срока действия настоящей ограниченной гарантии клиент может вернуть прибор для повторной калибровки, технического обслуживания и проверки качества;

Поддержка по телефону:

Компания BFDX в настоящее время предлагает круглосуточную телефонную поддержку клиентов, которую они могут получить, позвонив в отдел поддержки клиентов BFDX в соответствии с условиями и ограничениями настоящей ограниченной гарантии.

6. ПРЕДОСТАВЛЕНИЕ ГАРАНТИЙ СТОРОННИХ КОМПАНИЙ.

Несмотря на то, что компания BFDX не предоставляет расширение гарантии и не несет ответственности или обязательств в отношении продукции, предоставляемой третьими лицами, компания BFDX предоставляет (насколько это разрешено) Клиенту любые применимые гарантии сторонних производителей.

7. ИНИЦИИРОВАНИЕ ГАРАНТИЙНЫХ ТРЕБОВАНИЙ И ОБСЛУЖИВАНИЯ.

Чтобы получить гарантийное обслуживание, обратитесь в Службу поддержки клиентов для оценки претензии, как указано выше. Служба поддержки клиентов может попросить клиента сообщить о проблеме в письменной форме. Сотрудники компании BFDX могут попытаться решить проблему по телефону. Если вашу проблему невозможно решить по телефону, компания BFDX определит (на своё усмотрение) наиболее приемлемое решение, которое может включать в себя один или несколько следующих вариантов: (i) отправка новых или отремонтированных запасных частей на основе обмена вместе с инструкциями для Клиента по выполнению установки, (ii) отправка нового или отремонтированного анализатора, который, как минимум, функционально эквивалентен имеющемуся анализатору, на основе обмена, (iii) отправка нового, проходящего сервисное обслуживание или отремонтированного анализатора, который, как минимум, функционально эквивалентен имеющемуся анализатору, на основе "временной замены", (iv) помощь со стороны уполномоченных сервисных инженеров компании BFDX или дистрибьюторов на территории Клиента, или (v) выдача разрешения для Клиента на возврат продукта для ремонта или замены компанией BFDX. Если компания BFDX принимает решение отправить клиенту заменяющий продукт, исходный продукт становится собственностью компании BFDX после получения клиентом замены. Клиент должен вернуть исходный продукт компании BFDX в течение двадцати (20) дней после получения заменяющего продукта или оплатить компании BFDX розничную стоимость заменяющего продукта.

8. ТРЕБОВАНИЯ К КЛИЕНТУ ПО ВОЗВРАТУ ДЛЯ ОБСЛУЖИВАНИЯ.

Если компания BFDX принимает решение отремонтировать дефектный продукт на своем предприятии, дефектный продукт должен быть получен компанией BFDX не позднее чем через тридцать (30) дней после даты выдачи компанией BFDX разрешения на возврат. Перед отправкой дефектного продукта в компанию BFDX клиент должен выполнить инструкции по возврату, указанные компанией BFDX, включая, без ограничений, обеззараживание, процедуры резервного копирования данных, другие процедуры, указанные компанией BFDX, и все инструкции по транспортировке. Несоблюдение всех инструкций может привести к задержке обратной транспортировки продукта. Клиент несет полную ответственность за отправку в компанию BFDX продукта, очищенного от любых биологических, химических или органических веществ, соединений или токсинов и иных загрязнений, согласно применимым законам, правилам и нормативным документам, а компания BFDX оставляет за собой право отказать в доставке или возврате продукта без оказания услуг, если клиент неполностью выполняет данное требование. Кроме того, клиент полностью отвечает за резервное копирование всех данных, которое позволит клиенту восстановить или воспроизвести потерянные или измененные данные, и удаление любой конфиденциальной информации, собственной информации или персональных данных. Компания BFDX снимает с себя всю ответственность за любые потери, повреждения или поломки программного обеспечения, данных или другой информации, хранящихся на любом носителе данных или любом компоненте любого продукта, на который распространяется гарантия, и компания BFDX не несет ответственности за удаление или изменение содержимого любого жесткого диска или носителя информации, которые могут быть созданы в процессе эксплуатации продукта. Компания BFDX не несет ответственности за восстановление или переустановку любых программ или данных, кроме программного обеспечения, установленного компанией BFDX при первичном изготовлении анализатора. При ремонте компания BFDX оставляет за собой право использовать восстановленные или замененные детали, или детали, которые по крайней мере функционально эквивалентны оригинальным спецификациям изготовителя.

9. ГАРАНТИЯ ПРИ ВОЗВРАТЕ ИЗ СТРАН, КРОМЕ США

Если требуется возврат анализатора, контролируемого международными правилами перевозки вооружений, в компанию BFDX из стран за пределами континентальной части США, Вам следует выполнить все этапы, которые перечислены в Разделе 8. Несоблюдение всех инструкций может привести к запрету на экспорт в США, что может потребовать получения дополнительного разрешения на экспорт. Кроме того, несоблюдение условий транспортировки может привести к задержке обратной доставки анализатора клиенту на несколько недель. Клиенты, которые находятся за пределами США, могут запросить дополнительную информацию у уполномоченного дистрибьютора.

10. ВРЕМЯ ОЖИДАНИЯ ГАРАНТИЙНОГО ОБСЛУЖИВАНИЯ.

Если дефектный продукт отправляется в компанию BFDX в соответствии с разрешением на возврат, компания BFDX проведет ремонтные работы или заменит продукт и доставит его клиенту как можно скорее, и в большинстве случаев в течение десяти (10) рабочих дней после получения компанией BFDX дефектного продукта и всей необходимой документации по разрешению на возврат. За исключением нарастающей стоимости транспортировки, как указано выше, компания BFDX не будет нести ответственности за какие-либо задержки в оказании услуг в рамках данной ограниченной гарантии.

11. НАРУШЕНИЯ УСЛОВИЙ.

В случае любого нарушения условий данной ограниченной гарантии: (i) применительно к анализаторам, Вашим единственным средством правовой защиты будет обязательство компании BFDX бесплатно произвести ремонт или заменить анализатор с использованием новых или отремонтированных компонентов, бесплатно, и (ii), применительно к программному обеспечению или кассетам с реагентами, Вашим единственным средством правовой защиты будет обязательство компании BFDX произвести ремонт, заменить или исправить программное обеспечение или кассеты с реагентами (в том числе, на

усмотрение компании BFDX, замену на новую версию программного обеспечения). В данную ограниченную гарантию отдельно включены работа и материалы. Компания BFDX оплачивает все расходы, связанные с доставкой и обратной доставкой продукта, только в течение срока действия данной ограниченной гарантии.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ.

Кроме перечисленного выше, компания BFDX не делает никаких дополнительных заявлений или гарантий какого-либо рода или характера в отношении продуктов. Любое описание продуктов, содержащееся на веб-сайте компании BFDX или в промоционных материалах, имеет целью только их идентификацию. Компания BFDX не делала никаких заявлений по факту или обещаний ни на своем веб-сайте, ни иным образом, которые будут давать гарантию, что продукты соответствуют заявлению или обещанию. КОМПАНИЯ BFDX ОТКАЗЫВАЕТСЯ ОТ ВСЕХ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫХ ГАРАНТИЙ, ВКЛЮЧАЯ ТАКОВЫЕ БЕЗ ОГРАНИЧЕНИЙ, ЛЮБЫЕ ПОДРАЗУМЕВАЕМЫЕ ГАРАНТИИ ПРАВА, НЕНАРУШЕНИЯ, СОВМЕСТИМОСТИ, ТОВАРНОГО КАЧЕСТВА ИЛИ ПРИГОДНОСТИ ДЛЯ КОНКРЕТНОЙ ЦЕЛИ. КОМПАНИЯ BFDX НЕ ГАРАНТИРУЕТ, НЕ УТВЕРЖДАЕТ И НЕ ДЕЛАЕТ НИКАКИХ ЗАЯВЛЕНИЙ, ЧТО ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ НЕ СОДЕРЖИТ ОШИБОК ИЛИ БУДЕТ ФУНКЦИОНИРОВАТЬ БЕСПЕРЕБОЙНО. Весь риск, возникающий в связи с использованием или рабочими характеристиками продуктов, остается на стороне клиента. Компания BFDX не будет нести ответственность за потерю или повреждение системы, программ или данных; расходы на поставку заменяющих товаров, услуг или технологии; или любые специальные, косвенные, дополнительные, второстепенные или штрафные убытки, включая, но не ограничиваясь, возмещение упущенных коммерческих возможностей или приостановление деятельности предприятия, исходя из принципов контракта, гарантии, оплошности, безусловной ответственности или деликта, нарушения установленных законом обязанностей, принципов возмещения или вклада, или любой другой теории ответственности, даже если компания BFDX была предупреждена о возможности таких убытков. Несмотря на любые противоречия в настоящей ограниченной гарантии, ни при каких обстоятельствах ответственность компании BFDX (в связи с иском на основании контракта, гарантии, деликта или иным образом), если таковые имеются, перед клиентом согласно данной ограниченной гарантии не будет превышать фактическую сумму, полученную компанией BFDX в связи с продажей и распространением соответствующего продукта(ов).

13. РАЗНОЕ

(i) Все положения соглашения по данной ограниченной гарантии являются обязательными и обеспечивают защиту интересов сторон и их законных представителей, преемников и правопреемников. Компания BFDX может передавать свои права и делегировать свои обязанности по данной гарантии путем письменного уведомления клиента.

(ii) Данная ограниченная гарантия и соответствующий сертификат покрытия составляют понимание сторон в отношении предмета настоящего документа. Никакие поправки, модификации, отмены или изменения настоящих условий не будут иметь обязательной силы, если они не сделаны в письменной форме и не подписаны компанией BFDX.

(iii) Предполагается, что каждое из положений настоящей ограниченной гарантии может существовать отдельно. Если какое-либо условие или положение является незаконным или недействительным по любой причине, такая незаконность или недействительность не будет влиять на действительность остальных положений данной ограниченной гарантии.

(iv) Компания BFDX и клиент соглашаются, что действия, конструкции и производительность данной ограниченной гарантии будут регулироваться законами штата Юта, США (за исключением принципов коллизионного права данного законодательства. Место для проведения любого спора или разбирательства, возникающего из или связанного с данной ограниченной гарантией, будут полностью законным в суде любого штата или федеральном суде, расположенном в Солт-Лейк-Каунти, штат Юта, США, и каждая сторона безоговорочно и безусловно соглашается на юрисдикцию таких судов и

безусловно и безоговорочно отказывается от (i) любого права на суд присяжных и (ii) каких-либо претензий, возражений или споров, материальных или процессуальных, на основании отсутствия персональной юрисдикции, неудобного места проведения или подобных причин.

(v) За исключением случаев, прямо запрещенных соответствующим законодательством, компания BFDX и клиент будут лишены возможности и, согласно настоящему документу, безоговорочно и безусловно отказываются от права предъявлять любые претензии, требования или иски, вытекающие из или в связи с настоящей ограниченной гарантией более чем через один (1) год после окончания срока действия данной ограниченной гарантии.

14. ПОЛОЖЕНИЯ, КАСАЮЩИЕСЯ ПРАВИТЕЛЬСТВА США.

Компания BFDX гарантирует правительству США, что продукты, поставляемые по настоящему документу, являются товарными и пригодны для использования в конкретных целях, описанных в соответствующем договоре. В случае, если условия ограниченной гарантии компании BFDX вступают в противоречие с условиями гарантии, содержащимися в настоящем пункте, регулировать договор будут условия настоящего пункта, если иное решение не указано в решении суда. Если иное не предусмотрено прямой гарантией, компания BFDX не несет ответственности перед правительством Соединенных Штатов Америки или любым из его агентств, сотрудников или агентов в случае нарушения гарантийных обязательств за косвенные убытки, возникшие в результате каких-либо дефектов или недостатков в принятых изделиях. В том случае, если условия ограниченной гарантии компании BFDX в положении(ях) об ограничении ответственности налагают большие ограничения ответственности компании BFDX, чем условия, содержащиеся в этом пункте, договор будет регулироваться условиями настоящего пункта.

Для получения дополнительной информации об ограниченной или расширенной гарантии компании BFDX, а также для получения предложения по покрытию для Вашего анализатора, пожалуйста, свяжитесь с нами по телефону 1 - 800-735-6544. Будьте готовы сообщить серийный номер Вашего анализатора при запросе котировки.

Рекламация

Для получения технической консультации и поддержки просьба обращаться к уполномоченному представителю производителя на территории Российской Федерации:

ООО «БиоМерье Рус»

Адрес: Россия, 115230, Москва, 1-ый Нагатинский проезд, д. 10, стр. 1

Тел./факс: +7 (495) 221 10 79

Телефон горячей линии: 8 (800) 250 10 79

e-mail: info.russia@biomerieux.com

веб-сайт: www.biomerieux-russia.com

В случае выявления побочных действий, не указанных в инструкции по применению или руководстве по эксплуатации медицинского изделия, нежелательных реакций при его применении, особенностей взаимодействия медицинских изделий между собой, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации медицинских изделий, необходимо направить сообщение, содержащее указанные сведения, в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения в соответствии с действующим законодательством.

Дополнение к разделу "Необходимые, но не поставляемые материалы"

Системы семейства FilmArray производства BioFire, а именно:

1. «Анализатор FilmArray 2.0» для проведения мультиплексной ПЦР с целью обнаружения нуклеиновых кислот-мишеней в клинических образцах (регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9230), включая сопутствующее программное обеспечение и Станцию загрузочную.
2. «Анализатор FilmArray Torch» для проведения мультиплексной ПЦР с целью обнаружения нуклеиновых кислот-мишеней в клинических образцах, с принадлежностями (в процессе регистрации), включая сопутствующее программное обеспечение и Станцию загрузочную.

Дополнение к разделу "Эффективность обнаружения".

В ходе клинических испытаний на территории Российской Федерации было исследовано 318 проб биоматериала (носоглоточные мазки). Ввиду низкой распространенности исследуемых патогенов, большинство положительных проб были получены путем добавления к пробам биоматериала, взятым в ходе лечебно-диагностического процесса, образцов верификационной респираторной панели NATtrol™ Респираторная панель 2 (RP2) (NATRP2-BIO), производства ZeptoMetrix Corporation, США.

Диагностические характеристики (чувствительность и специфичность) медицинского изделия Набор реагентов BioFire Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus)

Аналит	Доверительный интервал	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Adenovirus (Аденовирус)	95 %	100.00% (92.89% - 100.00%)	100.00% (98.47% - 100.00%)
Coronavirus 229E (Коронавирус 229E)	95 %	100.00% (92.60% - 100.00%)	100.00% (98.59% - 100.00%)
Coronavirus HKU1 (Коронавирус HKU1)	95 %	100.00% (91.18% - 100.00%)	100.00% (98.62% - 100.00%)
Coronavirus NL63 (Коронавирус NL63)	95 %	100.00% (92.45% - 100.00%)	100.00% (98.64% - 100.00%)
Coronavirus OC43 (Коронавирус OC43)	95 %	100.00% (89.42% - 100.00%)	100.00% (89.66% - 100.00%)
Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) (Коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV))	95 %	100.00% (92.60% - 100.00%)	100.00% (98.57% - 100.00%)
Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2))	95 %	100.00% (97.20% - 100.00%)	100.00% (97.91% - 100.00%)
Human Metapneumovirus (Метапневмовирус человека)	95 %	100.00% (92.60% - 100.00%)	100.00% (98.59% - 100.00%)
Human Rhinovirus/Enterovirus (Риновирус/энтеровирус человека)	95 %	100.00% (95.49% - 100.00%)	100.00% (98.32% - 100.00%)
Грипп А, включая подтип FluA-H1-2	95 %	100.00% (89.42% - 100.00%)	100.00% (98.61% - 100.00%)
Грипп А, включая подтип FluA-H1-2009	95 %	100.00% (90.97% - 100.00%)	100.00% (98.60% - 100.00%)
Грипп А, включая подтип FluA-H3	95 %	100.00% (87.66% - 100.00%)	100.00% (98.66% - 100.00%)
Influenza B (Грипп В)	95 %	100.00% (96.45% - 100.00%)	100.00% (98.16% - 100.00%)
Parainfluenza Virus 1 (Вирус парагриппа 1)	95 %	100.00% (89.42% - 100.00%)	100.00% (98.61% - 100.00%)
Parainfluenza Virus 2 (Вирус парагриппа 2)	95 %	100.00% (89.42% - 100.00%)	100.00% (98.61% - 100.00%)
Parainfluenza Virus 3 (Вирус парагриппа 3)	95 %	100.00% (89.42% - 100.00%)	100.00% (98.61% - 100.00%)
Parainfluenza Virus 4 (Вирус парагриппа 4)	95 %	100.00% (84.56% - 100.00%)	100.00% (98.69% - 100.00%)
Respiratory Syncytial Virus (Респираторно-синцитиальный вирус)	95 %	100.00% (90.26% - 100.00%)	100.00% (98.62% - 100.00%)
Бактерии:			
Bordetella parapertussis	95 %	100.00% (89.42% - 100.00%)	100.00% (98.61% - 100.00%)
Bordetella pertussis	95 %	100.00% (92.75% - 100.00%)	100.00% (98.55% - 100.00%)
Chlamydia pneumoniae	95 %	100.00% (89.42% - 100.00%)	100.00% (98.61% - 100.00%)
Mycoplasma pneumoniae	95 %	100.00% (90.97% - 100.00%)	100.00% (98.60% - 100.00%)

ИСТОРИЯ РЕДАКЦИЙ

Версия	Дата редакции	Описание редакции(-ий)
01	Июль 2020 г.	Первичный выпуск

УКАЗАТЕЛЬ

Предусмотренное назначение	1
Назначение	1
Предполагаемый пользователь и среда использования	2
Общая информация и принцип действия	3
Краткий обзор обнаруживаемых микроорганизмов	3
Принцип процедуры	5
Поставляемые материалы	6
Необходимые, но не поставляемые материалы	6
Предупреждения и меры предосторожности	7
Общие предупреждения	7
Правила техники безопасности	7
Внутрилабораторные меры предосторожности	8
Предупреждения относительно сообщений в органы здравоохранения	9
Меры предосторожности, связанные с регламентом REACH (EC 1907/2006)	10
Хранение, использование и стабильность реагентов	10
Требования к образцам	11
Процедура	11
Этап 1. Подготовка кассеты	11
Этап 2. Внесение раствора для регидратации в кассету	12
Этап 3. Подготовка образца	13
Этап 4. Загрузка смеси образца	14
Этап 5. Запуск кассеты	14
Контроль качества	17
Технологический контроль качества	17
Мониторинг производительности тест-системы	17
Внешний контроль	17
Интерпретация результатов	18
Интерпретация результатов анализа	18
Интерпретация микроорганизмов	18
Протокол испытаний BioFire RP2.1plus	20
Ограничения	23
BioFire RP2.1PLUS и BioFire RP2PLUS	26
Ожидаемые значения	26

Эффективность обнаружения	29
Клиническая эффективность теста на SARS-CoV-2 панели BioFire RP2.1 <i>plus</i> и сравнение с BioFire RP2 <i>plus</i>	29
Клиническая эффективность BioFire RP2 <i>plus</i> (тесты, сохраненные в BioFire RP2.1 <i>plus</i>)	32
Предел обнаружения	40
Аналитическая реактивность (инклюзивность)	42
Аналитическая специфичность (перекрестная реактивность)	48
Воспроизводимость	51
Интерференция	55
Приложение А	57
Глоссарий символов	57
Приложение В	58
Контактная и юридическая информация	58
Гарантийные обязательства	58
Приложение С	59
Справочные материалы	59
Приложение D	61
Описание медицинского изделия для <i>in vitro</i> диагностики	61
Сопроводительная информация производителя к изделию	63
Дополнение к разделу «Предупреждения и меры предосторожности»	71
Дополнение к разделу «Эксплуатационные характеристики»	75
Дополнение к разделу «Стабильность реагентов при хранении и в процессе эксплуатации»	75
Перечень применяемых стандартов	76
Физико – химические свойства	76
Условия транспортировки	77
Анализ и управление рисками	77
Защита окружающей среды	77
Стерилизация	77
Техническое обслуживание и ремонт	77
Утилизация	77
Гарантии изготовителя	78
Рекламация	83
Дополнение к разделу «Необходимые, но не поставляемые материалы»	84
Дополнение к разделу «Эффективность обнаружения»	85
История редакций	86
Указатель	87

Перевод с английского языка на русский

ШТАТ ЮТА)
ОКРУГ СОЛТ-ЛЕЙК) §

Сегодня, 11 марта 2022 года, ко мне, Сёрен Кэйсон ВУД (Soren Cason Wood), государственному нотариусу, лично явилась Натали Пупуни (Natalie Pupunu) и представила достаточные доказательства того, что является человеком, подписавшим данный документ, его личность была подтверждена.

Засвидетельствовано моей рукой и скреплено официальной печатью.

/Подпись/

Сёрен Кэйсон ВУД (Soren Cason Wood), государственный нотариус

/Штамп/

ОФИЦИАЛЬНАЯ ПЕЧАТЬ ШТАТА ЮТА 1896	СЁРЕН КЕЙСОН ВУД (SOREN CASON WOOD)
	Государственный нотариус
	Штат Юта
	Регистрация действительна до: 11 января 2025 г. Per. № 716101

Утверждено:

Подпись: /Натали Пупуни/

Дата: 11 марта 2022 года

Печать

Отдел по регуляторным и
клиническим вопросам
«БиоФаер Диагностикс, ЛЛС»
515 Colorow Drive
Salt Lake City, Utah 84108
USA (США)

/подпись/
БИОФАЕР
КОМПАНИЯ
БИОМЕРЬЕ/

515 Colorow Drive • Salt Lake City, Utah 84108 USA • 801 738 6354 местный • 1 800 735 6544
бесплатно • 801 588 0507 факс

biofiredx.com

Перевод данного текста выполнен переводчиком Алексеевым Алексеем Александровичем.

Российская Федерация

Город Москва.

Двадцать девятого марта две тысячи двадцать второго года.

Я, Прокошенкова Елена Евгеньевна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Алексеева Алексея Александровича.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 21/86-н/77-2022-

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.

Е.Е. Прокошенкова

Прошнуровано, пронумеровано и скреплено печатью 93 лист (-а,-ов).

Е.Е. Прокошенкова

**Инструкции на контрольные материалы,
используемые для оценки аналитической
специфичности в части вне тестовых
микроорганизмов, медицинского изделия для
диагностики *in vitro* «Набор реагентов BioFire
Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1plus)» для
обнаружения и идентификации нуклеиновых
кислот возбудителей респираторных инфекций в
образцах носоглоточных мазков методом
мультиплексной ПЦР на системах семейства
FilmArray».**

1. Инструкция на NATtrol™ BCID2 Контрольная панель возбудителей для тестов на идентификацию гемокультур (NATBCP2-BIO)
2. Инструкция на NATtrol™ Meningitis/Encephalitis (ME) Panel Контрольная панель возбудителей менингита/энцефалита (NATMEP-BIO), лот 325631 годен до 01.03.2022
3. инструкция на NATtrol™ Контрольная панель бактериальных возбудителей пневмонии (NATPPQ-BIO) и NATtrol™ Контрольная панель вирусных и атипичных бактериальных возбудителей пневмонии (NATPPA-BIO)
4. Инструкция на Материалы контрольные KWIK-STIK
5. Инструкция на Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловируса (CMV) и вируса герпеса 6 типа (HHV6) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме "реального времени" "АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL" по ТУ 9398-095-01897593-2012 (№ ФСР 2010/09502 от 18.10.2019)
6. Инструкция на Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Mycoplasma hominis*/*Mycoplasma genitalium*) по ТУ 9398-248-23548172-2015 (№ РЗН 2017/5593 от 06.04.2017)
7. Инструкция на Набор реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*) по ТУ 9398-413-23548172-2013 (№ РЗН 2014/2213 от 25.03.2017)
8. Инструкция на Набор реагентов для выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum*) по ТУ 9398-155-23548172-2015 (№ РЗН 2016/3793 от 10.02.2017)
9. Инструкция на Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae/tox-genes-FL* (№ РЗН 2019/8915 от 18.09.2019)
10. Инструкция на Набор реагентов для диагностики бактериального вагиноза (определения концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL" по ТУ 9398-169-01897593-2011 (№ ФСР 2012/13616 от 09.12.2019)
11. Инструкция на Набор реагентов для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis* complex) в клиническом материале, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® МТС-FL» по ТУ 9398-107-01897593-2012 (№ ФСР 2010/09556 от 13.03.2019)
12. Инструкция на Набор реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL" по ТУ 9398-195-01897593-2011 (№ ФСР 2012/13923 от 13.03.2019)
13. Инструкция на Тест-система «ЛПС» для выявления патогенных лептоспир методом полимеразной цепной реакции
НАЗНАЧЕНИЕ Тест-система «ЛПС» предназначена для выявления 16S РНК патогенных лептоспир в биологическом материале от животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»
14. Инструкция на Набор реагентов для выявления ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® *Pneumocystis jirovecii* (carinii) FL" по ТУ 9398-182-01897593-2011 (№ ФСР 2012/13617 от 13.03.2019)

15. Инструкция на Набор реагентов для выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (ОРВИ): РНК респираторно-синцитиального вируса (human Respiratory Syncytial virus - hRSv), метапневмовируса (human Metapneumovirus - hMpv), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (human Parainfluenza virus - 1-4 - hPiv), коронавирусов (human Coronavirus - hCov), риновирусов (human Rhinovirus - hRv), ДНК аденовирусов групп В, С и Е (human Adenovirus В, С, Е - hAdv) и бокавируса (human Bocavirus - hBov) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL" по ТУ 9398-155-01897593-2010 (№ ФСР 2011/11258 от 26.02.2019)

16. Инструкция на Набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест-Вет ДНК *Bordetella bronchiseptica*) (Декларация о соответствии № РОСС RU.Д-RU.PA01.B.63819/20 от 21.12.2020)

ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА:

NATtrol™ BCID2 Контрольная панель возбудителей для тестов на идентификацию гемокультур (BCID2)* создана из очищенных, интактных клеток бактерий и грибов. Клетки были химически модифицированы с целью получения неvirulentного продукта, устойчивого при хранении в условиях холодильника. Набор NATBCP2-BIO включает 34 флакона по 0.2 мл бактерий и грибов NATtrol™ и 1 x 0.2 мл отрицательного контроля (только матрица) как перечислено в Таблице 1. Компоненты набора поставляются в запатентованной матрице.

*Патент:

<http://www.zeptometrix.com/patent-information/>

ПРЕДУСМОТРЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ:

- Набор NATtrol™ BCID2 разработан для оценки эффективности тестов по определению нуклеиновой кислоты присутствующих бактерий и грибов (микроорганизмов, перечисленных в Таблице 1). Панель культур для идентификации крови NATtrol™ может также использоваться для валидации клинического количественного анализа, разработки диагностических тестов и обучения лабораторного персонала.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

- Инактивация NATtrol™ выполнена на маточных растворах микроорганизмов, используемых для формирования компонентов набора. Инактивация верифицирована на основании стандартного протокола микробиологического роста.
- Эта группа содержит инактивированные микроорганизмы и материалы животного и человеческого происхождения. Безопасная практика предусматривает, что эти контроли нужно рассматривать как потенциально инфекционные, и что необходимо соблюдать универсальные меры предосторожности при обращении с ними.
- Обращайтесь к руководствам Центра по контролю и профилактике заболеваемости (CDC) и региональным инструкциям при обработке и утилизации.
- Матрица, используемая в изготовлении этого продукта, обработана 0.09% азидом натрия. Она получена на основании сывороточного альбумина человека, который тестируется и доказана его неактивность на донорском уровне для антител HIV-1/HIV-2, HBsAg и антител против HCV согласно лицензированным методам скрининг-тестов FDA для доноров. Все материалы также тестируются на антитела к HIV-1 и HCV согласно методам тестирования нуклеиновой кислоты (NAT), одобренным FDA.
- Термически инактивированная эмбриональная бычья сыворотка, используемая в изготовлении этого продукта, отвечает требованиям, утвержденным Министерством сельского хозяйства США (USDA) для отслеживания материала животного происхождения, полученного из скотобойни. Материалы, накапливаемые в USDA, получены от лицензированных поставщиков, или официально импортированы из стран, одобренных USDA как страны с незначительным или контролируемым риском распространения губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE) и других экзотических заболеваний.

Донорские животные были осмотрены до и после забоя, согласно требованиям USDA.

- Не использовать после срока, указанного на этикетке.
- Чтобы избежать перекрестного загрязнения, необходимо использовать отдельные наконечники к пипеткам для всех материалов.

РЕКОМЕНДУЕМОЕ ХРАНЕНИЕ:

- Панель NATtrol™ BCID2 должна храниться при температуре 2-8°C.

ИНСТРУКЦИИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ:

- Энергично встряхнуть флакон в течение, по крайней мере, 5 секунд.
- Выполнить действия для исследуемого образца согласно инструкциям производителя.
- Экстрагировать нуклеиновые кислоты перед использованием контрольных образцов для наборов реагентов, которые не соответствуют типу «образец-результат».

ОГРАНИЧЕНИЕ:

- ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОЛЬКО В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ. НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУРАХ.

ТАБЛИЦА 1: КОМПОНЕНТЫ НАБОРА (ПАНЕЛИ):

**Этот штамм поставляется и используется согласно лицензии из Национальной коллекции типовых культур (NCTC®), здравоохранения Англии

Компоненты набора	Штамм	Компоненты набора	Штамм
<i>A. baumannii</i>	307-0294	<i>K. pneumoniae</i>	Z460** (CTX-M/NDM)
<i>B. fragilis</i>	Z029	<i>K. pneumoniae</i>	KPC-2
<i>C. albicans</i>	Z006	<i>K. pneumoniae</i>	Z138 (OXA-48/STX-M)
<i>C. auris</i>	Z485	<i>L. monocytogenes</i>	серотип 1/2b
<i>C. gattii</i>	Z156	<i>N. meningitidis</i>	серологическая группа A
<i>C. glabrata</i>	Z007	<i>P. aeruginosa</i>	Z139. VIM-1
<i>C. krusei</i>	Z009	<i>P. mirabilis</i>	Z050
<i>C. neoformans</i>	серотип A	<i>S. agalactiae</i>	Z019
<i>C. parapsilosis</i>	Z011	<i>S. aureus</i>	MRSA; COL
<i>C. tropicalis</i>	Z012	<i>S. enterica typhimurium</i>	Z005
<i>E. cloacae</i>	Z101	<i>S. epidermidis</i>	MSSE; HER 1292
<i>E. coli</i>	Z297; IMP**	<i>S. lugdunensis</i>	Z097
<i>E. coli</i>	Z521; mcr-1**	<i>S. maltophilia</i>	Z074
<i>E. faecalis</i>	VRE, Z345, vanB	<i>S. marcescens</i>	Z053
<i>E. faecium</i>	VRE, Z347, vanA	<i>S. pneumoniae</i>	Z022
<i>H. influenzae</i>	MinnA	<i>S. pyogenes</i>	Z018
<i>K. aerogenes</i>	Z052	Отрицательный	Не применимо
<i>K. oxytoca</i>	Z115		

FINATBCP2-BIO
Пересмотр: 01

Дата введения в действие: 25.06.2021

REF	Каталожный номер	Y	Температурные ограничения
LOT	Номер партии	5	Срок годности
RUC	Для использования только в целях исследования	6	Биологический риск
	Производитель		

№ PCAN21-112&21-172

NATtrol™ Meningitis/Encephalitis (ME) Panel

Контрольная панель возбудителей менингита/энцефалита

Номер по каталогу: NATMER-BIO

ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА:

NATtrol™ Meningitis/Encephalitis (ME) Panel Контрольная панель возбудителей менингита/энцефалита содержит очищенные, интактные вирусные частицы, бактериальные и грибковые клетки, которые были химически модифицированы с тем, чтобы сделать их неинфекционными и устойчивыми при хранении в холодильнике. Панель NATMER-BIO содержит 14 флаконов по 0,4 мл с вирусным, бактериальным и грибковым препаратом NATtrol™, как указано в Таблице 1. Эти панели поставляются в очищенной белковой матрице, которая является миметиком состава настоящего клинического образца.

*Патент: <http://www.zeptometrix.com/patent-information/>

ПРЕДУСМОТРЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ:

- NATtrol™ Meningitis/Encephalitis (ME) Panel Контрольная панель возбудителей менингита/энцефалита предназначена для оценки эффективности тестов на нуклеиновые кислоты для определения присутствия вирусных, бактериальных и грибковых нуклеиновых кислот. Панель NATMER-BIO также может быть использована для проверки клинических анализов, разработки диагностических тестов и обучения лабораторного персонала.
- Панель NATMER-BIO содержит интактные организмы, и ее необходимо использовать таким же образом, который применяется в отношении клинических образцов.

ЭТИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС/ТЕСТИРОВАНИЕ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ ОПАСНОСТЬ:

- Инактивация NATtrol™ была проведена с использованием запасов, применяемых для формирования элементов панели. Инактивация была верифицирована отсутствием подтверждения роста в валидированных анализах инфекционности на основе тканевой культуры и в протоколах роста.
- Очищенная белковая матрица, используемая при изготовлении этого продукта, обрабатывается 0,09% азидом натрия. Она изготавливается из материалов, которые были протестированы и оказались неактивными на уровне доноров для антител к ВИЧ-1 / ВИЧ-2, поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (HCV Antibody) с помощью лицензированных FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) методов скрининга доноров. Все материалы также тестируются на ВИЧ-1 и вирус гепатита С (HCV) с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот (NAT), одобренных FDA. Термически инактивированные исходные материалы крупного рогатого скота, используемые при производстве настоящего продукта, соответствуют применимым требованиям USDA (Министерства сельского хозяйства США) в отношении животных, взятых со скотобойни, отслеживаемости и страны происхождения. Материалы были собраны в лицензированных учреждениях USDA или легально импортированы из стран, в которых риск развития губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE) и других возбудителей экзотических болезней признан USDA незначительным либо контролируемым. Животные-доноры были осмотрены на скотобойне при жизни и в ходе вскрытия в соответствии с требованиями USDA.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

- Не смотря на то, что панель NATMER-BIO содержит инактивированные организмы, с ней следует обращаться так, как с потенциально инфекционным материалом.
- Используйте универсальные меры предосторожности при обращении с данным продуктом.
- Для предотвращения перекрестного микробиологического загрязнения, используйте разные наконечники пипеток для всех реактивов.

РЕКОМЕНДОВАННЫЙ РЕЖИМ ХРАНЕНИЯ:

- NATtrol™ Meningitis/Encephalitis (ME) Panel Контрольную панель возбудителей менингита/энцефалита следует хранить при температуре 2-8°C.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ:

- Настоящая панель прошла тестирование в ходе анализа с использованием BioFire Diagnostics FilmArray Контрольной панели возбудителей менингита/энцефалита Meningitis/Encephalitis (ME) и позволяет получить все ожидаемые результаты по компонентам панели, приведенным в Таблице 1. Необходимо следовать рекомендациям производителя тест-системы по использованию данной контрольной панели.
- Экстрагировать нуклеиновые кислоты перед использованием контрольных образцов для наборов реагентов, которые не соответствуют типу «образец-результат».

Таблица 1: КОМПОНЕНТЫ ПАНЕЛИ

Элемент панели	Штамм
<i>Escherichia coli</i>	0.1285; O18:H7:K1**
<i>Haemophilus influenzae</i>	Minna
<i>Listeria monocytogenes</i>	Serotype 1/2b
<i>Neisseria meningitidis</i>	Serogroup A
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Z019
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Z022
<i>Cryptococcus gattii</i>	Z156
Цитомегаловирус	AD-169
Эховирус типа 11	н.д.
HSV1	MacIntyre
HSV2	MS
HHV6	Z29
Парэховирус 3-го типа	Н/Д
VZV	Ellen

НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ. ИСПОЛЬЗОВАТЬ ТОЛЬКО ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ. НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР.

Данные продукты предназначены для исследований, разработки продукта, обеспечения качества или использования на производстве. Данные продукты НЕ предназначены для использования в производстве или обработке инъекционных препаратов, подлежащих лицензированию согласно разделу 351 Закона о службе общественного здравоохранения или для любого иного продукта, предназначенного для введения людям.

** Настоящий штамм ECRC № 0.1285 был предоставлен д-ром Чоуби ДебРоем (Chobi DebRoy) из Референтного центра по кишечной палочке *E. coli* по лицензии Исследовательского фонда штата Пенсильвания.

Настоящий продукт изготовлен на предприятии, которое имеет Систему менеджмента качества, сертифицированную в соответствии со стандартом ISO 13485

REF	Номер по каталогу		Температурное ограничение
LOT	Номер партии		Дата окончания срока годности
RUC	Для использования только в целях исследования		Биологический риск

ZeptoMetrix Corporation
878 Main Street
Buffalo, NY 14202
800-274-5487
www.zeptometrix.com

ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА:

NATtrol™ Контрольные панели возбудителей пневмонии: NATtrol™ Контрольная панель бактериальных возбудителей пневмонии — Поддающихся количественному определению бактерий и вирусов (NATPPQ-BIO)* и NATtrol™ Контрольная панель вирусных и атипичных бактериальных возбудителей пневмонии (NATPPA-BIO)* содержат очищенные, интактные вирусные частицы и бактериальные клетки, которые были химически модифицированы с тем, чтобы сделать их неинфекционными и устойчивыми при хранении в холодильнике. Панель NATPPQ-BIO содержит 17 флаконов с бактериальным препаратом NATtrol™ по 0,2 мл и 3 флакона с отрицательным контролем по 1,2 мл, как указано в Таблице 1. Панель NATPPA-BIO содержит 12 флаконов с вирусным и бактериальным NATtrol™ по 0,2 мл и 2 флакона отрицательного контроля по 1,2 мл, как указано в Таблице 2. Панели поставляются в фирменной матрице.

*Патент: <http://www.zeptometrix.com/patent-information/>

ПРЕДУСМОТРЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ:

- NATtrol™ Контрольные панели возбудителей пневмонии предназначены для оценки эффективности тестов на нуклеиновые кислоты при определении наличия вирусных и бактериальных нуклеиновых кислот (из организмов, перечисленных в Таблице 1). Контрольные панели NATPPQ-BIO и NATPPA-BIO позволяют лабораториям отслеживать вариации при тестировании, производительность тестовых систем от партии к партии, изменения в действиях оператора и могут способствовать выявлению случайных или системных ошибок.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

- Инактивация NATtrol™ была проведена с использованием запасов, применяемых для формирования элементов панели. Инактивация была верифицирована на основе стандартного протокола микробиологического роста.
- Настоящая панель содержит инаktivированные микроорганизмы и материалы человеческого и животного происхождения. Безопасная практика предусматривает, что эти контроли нужно рассматривать как потенциально инфекционные, и что необходимо соблюдать универсальные меры предосторожности при обращении с ними.
- Необходимо руководствоваться методическими рекомендациями ЦКЗ и местными правилами обращения и утилизации.
- Матрица, используемая при изготовлении этого продукта, обрабатывается 0,09% раствором натрия. Она изготовлена из человеческого сывороточного альбумина, который был протестирован и признан нереактивным на уровне доноров в отношении антител к HIV-1/HIV-2, поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (HCV) с использованием методик скрининга доноров, лицензированных FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов). Все материалы также тестируются на HIV-1 и HCV с использованием одобренных FDA методов тестирования на нуклеиновые кислоты (NAT).

- Термически инаktivированные исходные материалы крупного рогатого скота, используемые при производстве настоящего продукта, соответствуют применимым требованиям USDA (Министерства сельского хозяйства США) в отношении животных, взятых со скотобойни, отслеживаемости и страны происхождения. Материалы были собраны в лицензированных учреждениях USDA или легально импортированы из стран, в которых риск развития губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE) и других возбудителей экзотических болезней признан USDA незначительным либо контролируемым. Животные-доноры были осмотрены на скотобойне при жизни и в ходе вскрытия в соответствии с требованиями USDA.

- Не следует использовать панель после даты окончания срока годности, указанной на этикетке.

- Для того, чтобы избежать перекрестного загрязнения, необходимо использовать отдельные наконечники для пипеток при работе со всеми материалами.

РЕКОМЕНДОВАННЫЙ РЕЖИМ ХРАНЕНИЯ:

- NATtrol™ контрольные панели возбудителей пневмонии следует хранить при температуре 2-8°C.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ:

- Энергично встряхнуть флакон в течение как минимум 5 секунд.
- Обработать в соответствии с инструкциями производителя по образцам, необходимым для получения результата.
- Экстрагировать нуклеиновые кислоты перед использованием контрольных образцов для наборов реагентов, которые не соответствуют типу «образец-результат».

ОГРАНИЧЕНИЕ:

- **ИСПОЛЬЗОВАТЬ ТОЛЬКО В ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЯХ. НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОЦЕДУР.**
- Материалы для контроля качества должны использоваться в соответствии с местными, государственными, федеральными требованиями и требованиями к аккредитации.
- Настоящий продукт не предназначен для замены средств контроля производителя, прилагаемых к тесту.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ:

- Каждая лаборатория обязана оценивать продукт и устанавливать свои собственные критерии приемлемости.
- Настоящая панель прошла тестирование в ходе анализа с использованием BioFire® Контрольной панели бактериальных возбудителей пневмонии и позволяет получить все ожидаемые результаты по элементам панели, приведенным в таблице 1.
- Таблицы, представленные ниже, приведены исключительно в качестве информационного материала.

ZeptoMetrix

Таблица 1. Компоненты панели

¹ Настоящий штамм получен и используется по лицензии, предоставленной Национальной коллекцией типовых культур (NCTC¹) Службы общественного здравоохранения Англии.

² Настоящий продукт реализуется корпорацией ZeptoMetrix по лицензии компании ViroNovative B.V. в соответствии с заявками на патенты, включая заявки на патенты США 10/371,099 и 10/371,122, а также любые патенты, выданные по заявкам, относящимся к PCT/N L02/00040 и PCT/US03/05271

NATPPQ-BIO		NATPPA-BIO	
Компонент панели	Штамм	Компонент панели	Штамм
<i>A. baumannii</i>	307-0294	Аденовирус 3-го типа	Н/П
<i>E. cloacae</i>	Z101	Аденовирус 31-го типа	Н/П
<i>E. coli</i>	Z297; IMP1	<i>S. pneumoniae</i>	CWL-029
<i>H. influenzae</i>	Minna	Коронавирус NL63	Н/П
<i>K. aerogenes</i>	Z052	Грипп А H3	A/Brisbane/10/07
<i>K. oxitoca</i>	Z115	Грипп В	B/Florida/02/06
<i>K. pneumoniae</i>	KPC2	<i>L. pneumophila</i>	Philadelphia
<i>K. pneumoniae</i>	Z138; OXA-48; CTX-M	<i>M. pneumoniae</i>	M129
<i>K. pneumoniae</i>	Z460; NDM-1 ¹	Метапневмовирус 8	Peru6-2003 ²
<i>M. catarrhalis</i>	Ne 11	Вирус парагриппа типа 1	Н/П
<i>P. aeruginosa</i>	Z139; VIM-1	Риновирус 1А	Н/П
<i>P. mirabilis</i>	Z050	RSV A2	Н/П
<i>S. agalactiae</i>	Z019	Отрицательный	Н/П
<i>S. aureus</i>	MRSA: COL		
<i>S. marcescens</i>	Z053		
<i>S. pneumoniae</i>	Z022		
<i>S. pyogenes</i>	Z018		
Отрицательный	Н/П		

** «Настоящий продукт реализуется корпорацией ZeptoMetrix по лицензии компании ViroNovative B.V. в соответствии с заявками на патенты, включая заявки на патенты США 10/371,099 и 10/371,122, а также любые патенты, выданные по заявкам, относящимся к PCT/N L02/00040 и PCT/US03/05271».

REF	Номер по каталогу	✓	Температурное ограничение
LOT	Номер партии	Σ	Дата окончания срока годности
FOR	Для использования только в целях исследования	⊗	Биологический риск
	Производитель		

ZMC- PI-0041

Редакция: 02

Дата вступления в силу: 04.08.2021

РСА № 20-223, 21-112 и 21-172

www.ZeptoMetrix.com

ZeptoMetrix LLC • 878 Main Street, Buffalo, NY 14202 США • Tel (800) 274-5487

Настоящий продукт изготовлен на предприятии, которое имеет Систему менеджмента качества, сертифицированную в соответствии со стандартом ISO 13485

000 ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



- LYFO DISK™
- KWIK-STIK™
- KWIK-STIK™ Plus

LYFO DISK™

KWIK

KWIK Plus

НАЗНАЧЕНИЕ

Материалы контрольные KWIK-STIK предназначены для выполнения контроля при проведении исследований, контроля реагентов или сред, которые предназначены для использования в области микробиологии для выделения и идентификации культивируемого изолята микроорганизма

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Материалы контрольные с известными и прогнозируемыми характеристиками, используемые для контроля качества и в рамках программ обучения и оценки профессиональных навыков.

ПРИНЦИП

Материалы контрольные LYFO DISK™, KWIK-STIK™ и KWIK-STIK™ Plus обеспечивают результаты, эквивалентные традиционным методам, используемым при приготовлении, хранении и ведении запасов коллекций референсных штаммов. Препараты микроорганизмов имеют прослеживаемую связь с Американской коллекцией типовых культур (American Type Culture Collection (ATCC®)) или другими аутентичными коллекциями референсных штаммов.

СОСТАВ

Гранулы микроорганизмов LYFO DISK™, KWIK-STIK™ и KWIK-STIK™ Plus содержат популяцию микроорганизмов (>1000 КОЕ в каждой грануле), желатин, обезжиренное молоко, аскорбиновую кислоту, углевод и уголь. Желатин служит в качестве носителя микроорганизма. Обезжиренное молоко, аскорбиновая кислота и углевод защищают микроорганизм, сохраняя целостность клеточной стенки при лиофилизации и хранении. Уголь добавлен для нейтрализации любых токсичных веществ, образующихся в процессе лиофилизации.



ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА

- A. KWIK-STIK™:** каждая система KWIK-STIK™ содержит лиофилизированные микроорганизмы в виде гранулы, ампулу гидратирующей жидкостью и тампон для посева. Каждая система запечатана в ламинированный пакет, в котором находится влагопоглотитель для предотвращения накопления избыточной влажности. Материалы контрольные KWIK-STIK™ представляют собой четвертый или более ранний пассаж референсного штамма и доступны в форме выпуска по 2 или 6 систем в упаковке.
- B. KWIK-STIK™ Plus:** каждая система KWIK-STIK™ Plus содержит лиофилизированные микроорганизмы в виде гранулы, ампулу гидратирующей жидкостью и тампон для посева. Каждая система запечатана в ламинированный пакет, в котором находится влагопоглотитель для предотвращения накопления избыточной влажности. Материалы контрольные KWIK-STIK™ Plus представляют собой 2 пассаж референсного штамма и доступны в форме выпуска по 5 систем в упаковке.
- C. LYFO DISK™:** Материалы контрольные LYFO DISK™ упакованы во флакон с системой повторного закрытия по 6 гранул, содержащих лиофилизированные микроорганизмы и влагопоглотитель для предотвращения накопления избыточной влажности. Материалы контрольные LYFO DISK™ представляют собой 4 или более ранний пассаж референсного штамма.

Эти продукты были зарегистрированы как медицинские изделия в соответствии с законодательством в области медицинских изделий Пакистана.

ОСОБЫЕ УКАЗАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Данные продукты предназначены для диагностики *in-vitro*.
- Они не предназначены для употребления в пищу человеком, сельскохозяйственными или домашними животными.
- Более подробная информация представлена в паспорте безопасности. Паспорт безопасности можно найти на нашей веб-сайте по ссылке www.microbiologics.com или обратившись в службу технической поддержки по номеру телефона 320.229.7045 или бесплатному номеру телефона в США 1.866.286.6691.
- Гидратирующая жидкость в составе KWIK-STIK™ и KWIK-STIK™ Plus может вызывать серьезное раздражение глаз. При попадании в глаза, осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание. Если раздражение сохраняется, необходимо обратиться к врачу.
- Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица. Тщательно вымыть руки после работы.
- Данные системы содержат живые микроорганизмы, которые могут вызвать заболевания. Для предотвращения воздействия и контакта с растущими микроорганизмами следует соблюдать соответствующие правила работы.
- Микробиологическая лаборатория должна быть оборудована и иметь необходимые помещения для приема, обработки, поддержания, хранения и уничтожения биологически опасных материалов.
- К работе с данными система допускается только обученный персонал.

Утилизацию всех биологически опасных материалов регулируют агентства и нормативные документы. Каждая лаборатория должна знать и соблюдать требования к надлежащей утилизации биологически опасных материалов.

- Материалы контрольные LYFO DISK™, KWIK-STIK™ и KWIK-STIK™ Plus изготовлены без добавления природного латекса.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В НАБОР

- Для работы с Материалами контрольными LYFO DISK™ необходимы стерильные пробирки и 0,5 мл стерильной жидкости, например, триптон-соевого бульона (ТСБ), бульона на основе сердечно-мозговой вытяжки (БСМВ), солевого раствора или деионизированной воды для разведения лиофилизированного продукта. Для переноса разведенного препарата на поверхность плотной питательной среды необходимы стерильные тампоны или бактериологические петли.
- Для работы с Материалами контрольными LYFO DISK™, KWIK-STIK™ и KWIK-STIK™ Plus необходимы неселективные питательные или обогащённые среды, а также определённое время и условия инкубации, чтобы обеспечить оптимальный рост и развитие.

В Техническом информационном бюллетене (ТИБ.081) Рекомендованные условия роста перечислены рекомендованные питательные среды и требования к условиям инкубации. Этот бюллетень доступен на нашем веб-сайте в библиотеке документов по ссылке www.microbiologics.com.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

А. Процедура работы с Материалами контрольными KWIK-STIK™ и KWIK-STIK Plus™

1. Невскрытую упаковку с KWIK-STIK™ согреть до комнатной температуры. Оторвать край упаковки по насечке и извлечь систему KWIK-STIK™.
2. Отклеить отрывную часть этикетки и прикрепить её на чашку Петри для первичного посева или в журнал контроля качества (КК). Не следует разбирать систему во время растворения.
3. Сдавить (однократно) ампулу в верхней части системы KWIK-STIK™ (чуть ниже уровня мениска жидкости в ампуле), которая находится в колпачке, чтобы переместить из неё жидкость.
4. Удерживая систему вертикально, постучать ей по твердой поверхности, чтобы ускорить перетекание жидкости в нижнюю часть, где находится гранула.
5. Надавливая на нижнюю часть системы, растворить гранулу, перемешав ее с жидкостью до образования однородной суспензии.
6. Сразу после этого обильно смочить тампон в полученном посевном материале и перенести его на поверхность плотной питательной среды, или действовать в соответствии с СОП, принятой в лаборатории.
7. Выполнить посев на первичную чашку(и) Петри, осторожно распределив посевной материал тампоном на одну треть чашки Петри.
8. С помощью стерильной бактериологической петли, выполнить истощающий посев штрихами для получения изолированных колоний.
9. Выбросить систему KWIK-STIK™ в контейнер для отходов соответствующего класса.
10. Сразу же поместить засеянную(ые) чашку(и) Петри на инкубацию в условиях и при температуре, соответствующих виду микроорганизма.

В. Процедура работы с Материалами контрольными LYFO DISK™

1. Извлечь не вскрытый флакон LYFO DISK™ из холодильника с температурой 2°C - 8°C и не вскрывая оставить его на некоторое время для согревания до комнатной температуры.
2. Соблюдая правила асептики, извлечь из флакона одну гранулу с помощью стерильного пинцета. Не извлекать влагопоглотитель.
3. Поместить гранулу в 0,5 мл стерильной жидкости (вода, солевой раствор, ТСБ или БСМВ). Сразу же закрыть флакон пробкой и поместить на хранение при температуре 2°C - 8°C.
4. Растворить гранулу с помощью стерильного тампона до образования однородной суспензии. Сразу после этого обильно смочить стерильный тампон в полученной суспензии и перенести посевной материал на поверхность плотной питательной среды.
5. Выполнить посев на первичную чашку(и) Петри, осторожно распределив посевной материал тампоном на одну треть чашки Петри.
6. С помощью стерильной бактериологической петли, выполнить истощающий посев штрихами для получения изолированных колоний.
7. Оставшийся не использованным материал выбросить в контейнер для отходов соответствующего класса.

8. Сразу же поместить засеянную(ые) чашку(и) Петри на инкубацию в условиях и при температуре, соответствующих виду микроорганизма.

ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ

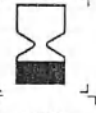
Материалы контрольные LYFO DISK™, KWIK-STIK™ и KWIK-STIK™ Plus следует хранить при температуре 2°C - 8°C в оригинальном запечатанном флаконе или упаковке, где содержится влагопоглотитель. Материалы контрольные LYFO DISK™, KWIK-STIK™ и KWIK-STIK™ Plus не следует использовать, если:

- Были нарушены условия хранения
- Есть признаки избыточного воздействия тепла и влаги
- Истек срок годности

ОГРАНИЧЕНИЯ

Данный продукт может использоваться не для всех наборов и процедур.

СИМВОЛЫ

EC REP	Уполномоченный представитель в Европейском сообществе
LOT	Код партии
	Биологический риск
CE	Знак соответствия основным требованиям директив и стандартов Европейского союза.
REF	Номер по каталогу
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
IVD	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Изготовитель
	Температурный диапазон
	Использовать до ...
	Обратитесь к инструкции по применению

ГАРАНТИЯ НА ПРОДУКТ

На данные продукты распространяется гарантия того, что они соответствуют спецификациям и рабочим характеристикам, указанным в тексте и на рисунках на вкладышах в упаковке, в инструкциях по применению и вспомогательной литературе. Гарантия, явная или подразумеваемая, ограничена, если:

- процедуры, выполняемые в лаборатории, противоречат информации, указанной в тексте и на рисунках в инструкциях по применению
- продукты используются в целях, не предусмотренных для данного продукта, как указано на вкладышах в упаковку, в инструкциях и вспомогательной литературе.

ВЭБ-САЙТ

Посетите наш веб-сайт www.microbiologics.com, для получения актуальной технической информации и информации о наличии продукции.

ВЫРАЖЕНИЕ БЛАГОДАРНОСТИ



Microbiologics, Inc.
200 Cooper Avenue North
St. Cloud, MN 56303 USA
Служба поддержки клиентов
Тел. 320-253-1640
Бесплатный телефон в США
800-599-BUGS (2847)
Электронная почта
info@microbiologics.com
Техническая поддержка
Тел. 320-229-7045
Бесплатный телефон в США
866-286-6691
Электронная почта
techsupport@microbiologics.com
www.microbiologics.com



MediMark® Europe
11, rue Emile Zola B.P. 2332
38033 Grenoble Cedex 2, France
Тел. 33 (0)4 76 86 43 22
Факс. 33 (0)4 76 17 19 82
Электронная почта
info@medimark-europe.com



Зарегистрированный модифицированный логотип ATCC, зарегистрированный модифицированный товарное слово ATCC и знак по каталогу ATCC являются товарными знаками ATCC. Microbiologics Inc. имеет разрешение на использование этих товарных знаков и продажу продуктов, являющихся производными штаммов ATCC®. Ищите зарегистрированный модифицированный логотип ATCC для распознавания продуктов, полученных из штаммов ATCC®.

LYFO DISK™

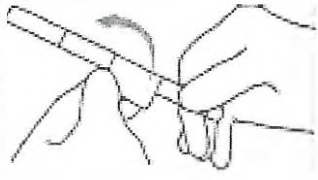
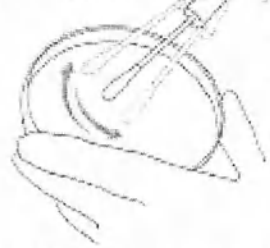
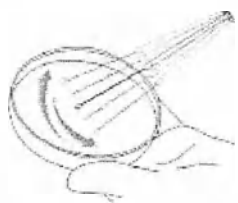
ИЛЛЮСТРИРОВАННЫЕ ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

1.  Извлечь не вскрытый флакон LYFO DISK™ из холодильника с температурой 2°C - 8°C и не вскрывая оставить его на некоторое время для согревания до комнатной температуры	2.  Соблюдая правила асептики, извлечь из флакона одну гранулу с помощью стерильного пинцета. Не извлекать влагопоглотитель	3.  Поместить гранулу в 0,5 мл стерильной жидкости (вода, солевой раствор, ТСБ или БСМВ). Сразу же закрыть флакон пробкой и поместить на хранение при температуре 2°C - 8°C.
4.  Растворить гранулу с помощью стерильного тампона до образования однородной суспензии. Сразу после этого обильно смочить стерильный тампоны в полученной суспензии и перенести посевной материал на поверхность плотной питательной среды	5.  Выполнить посев на первичную чашку(и) Петри, осторожно распределив посевной материал тампоном на одну треть чашки Петри 7. Оставшийся не использованным материал выбросить в контейнер для отходов соответствующего класса 	6.  С помощью стерильной бактериологической петли, выполнить истаощающий посев штрихами для получения изолированных колоний 8.  Сразу же поместить засеянную(ые) чашку(и) Петри на инкубацию в условиях и при температуре, соответствующих виду микроорганизма

 Microbiologics®

A safer, healthier world.

ИЛЛЮСТРИРОВАННЫЕ ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

1.  Невскрытую упаковку с KWIK-STIK™ согреть до комнатной температуры. Оторвать край упаковки по насечке и извлечь систему KWIK-STIK™	2.  Отклеить отрывную часть этикетки и прикрепить её на чашку Петри для первичного посева или в журнал контроля качества (КК). Не следует разбирать систему во время растворения	3.  Сдвинуть (однократно) ампулу в верхней части системы KWIK-STIK™ (чуть ниже уровня мениска жидкости в ампуле), которая находится в колпачке, чтобы переместить из неё жидкость
4.  Удерживая систему вертикально, постучать ей по твердой поверхности, чтобы ускорить перетекание жидкости в нижнюю часть, где находится гранула.	5.  Надавливая на нижнюю часть системы, растворить гранулу, перемешав ее с жидкостью до образования однородной суспензии	6.  Сразу после этого обильно смочить тампон в полученном посевном материале и перенести его на поверхность плотной питательной среды, или действовать в соответствии с СОП, принятой в лаборатории
7.  Выполнить посев на первичную чашку(и) Петри, осторожно распределив посевной материал тампоном на одну треть чашки Петри	8.  С помощью стерильной бактериологической петли, выполнить истощающий посев штрихами для получения изолированных колоний	9. Выбросить систему KWIK-STIK™ в контейнер для отходов соответствующего класса  10. Сразу же поместить засеянную(ые) чашку(и) Петри на инкубацию в условиях и при температуре, соответствующих виду микроорганизма

«УТВЕРЖДАЮ»

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



А.В. Горелов

«30» августа 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления
и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр
(EBV), цитомегаловируса (CMV) и вируса герпеса 6 типа (HHV6)
в клиническом материале методом полимеразной цепной
реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в
режиме «реального времени»

«АмплиСенс® EBV / CMV / HHV6-скрин-FL»

АмплиСенс®



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	10
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	10
ФОРМАТ FRT	12
СОСТАВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	13
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	14
А. Подготовка пробирок для амплификации	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	16
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	22
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО Glob	– эндогенный внутренний контрольный образец
K–	– отрицательный контроль ПЦР
K+	– положительный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ПК	– положительный контроль экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
CMV	– цитомегаловирус человека
EBV	– вирус Эпштейна-Барр
FRT	– флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
HHV6	– вирус герпеса 6 типа

НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление CMV, EBV и HHV6 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участков ДНК данных микроорганизмов и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. При экстракции ДНК из

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

клинического материала, содержащего клетки, происходит амплификация участка ДНК генома человека (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК возбудителя при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

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

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F.

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

Примечание – Форма 1 удалена.

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для амплификации и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), герпеса 6 типа (HHV6) и цитомегаловируса человека (CMV) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов

для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

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

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 4 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

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

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК вируса герпеса 6 типа, вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса человека. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании референсного штамма цитомегаловируса человека AD 169, панели QCMD на Эпштейн-Барр вирус, а также при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результата методом секвенирования фрагментов амплификации.

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП

1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку², биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо

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

открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром³. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по

³ Для удаления надсадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

- 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 и обратиться за медицинской помощью.
 - При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
 - Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

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

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

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки материала:

1. ГЕМОЛИТИК (РУ № ФСР 2010/09505) – реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).
2. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, США).

Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):

3. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или «ДНК-сорб-В» (РУ № ФСР 2009/05220).
4. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

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

5. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», «Ламинарные системы», Россия).
6. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
7. Автоматические дозаторы переменного объема от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл.
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 200 мкл в штативах.
9. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемым прибором).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Емкость для сброса наконечников.
13. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
14. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Ахуген, США) - при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

- цельная периферическая и пуповинная кровь

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

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

Получают из цельной периферической и/или пуповинной крови. Кровь может храниться при комнатной температуре в течение 6 ч с момента взятия. Для отбора белых клеток пробирку

с кровью центрифугировать в течение 20 мин при 800-1600 g (3 тыс об/мин), после этого отобрать белую пленку, образующуюся на поверхности отстоявшейся крови. Далее провести предобработку, описанную выше для цельной периферической и пуповинной крови. Допускается хранение белых клеток периферической и пуповинной крови при температуре не выше минус 68 °С в течение длительного времени.

Предобработку биоптатов внутренних органов, спинномозговой жидкости (ликвора) проводить в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Предобработка для слюны, смывов и мазков из ротоглотки не требуется.

ФОРМАТ FRT
СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), герпеса 6 типа (HHV6) и цитомегаловируса человека (CMV) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» –включает:

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

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК вирусов Эпштейна-Барр (EBV), герпеса 6 типа (HHV6) и цитомегаловируса человека (CMV) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» –включает:

<i>Реактив</i>		<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT EBV / CMV / HHV6 / Glob		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки

ФОРМАТ FRT

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
РНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ДНК-калибраторы	KSG1	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1 пробирка
	KSG2	Прозрачная бесцветная жидкость	1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ПКО ДНК EBV / CMV / HHV6 и ДНК человека		Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки

К набору реагентов прилагается на цифровом носителе или находится на официальном сайте Изготовителя программное обеспечение AmpliSens Soft Monitor FRT (в формате Microsoft® Excel) для автоматической обработки результатов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии

Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК EBV / CMV / HHV6** и ДНК человека.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

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

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

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

тестирования даже одного исследуемого образца ДНК в количественном формате необходимо проводить постановку пяти контрольных точек этапа амплификации ПЦР: два калибратора (KSG1 и KSG2) по два повтора и отрицательный контроль ПЦР (РНК-буфер). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше.

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

– 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *EBV / CMV / HHV6 / Glob*

– 5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).

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

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора. Раскапать в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
5. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл исследуемой ДНК, полученной в результате экстракции из клинических или контрольных образцов.

6. Для проведения качественного анализа:

а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – внести в пробирку 10 мкл РНК-буфера;

б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ДНК-калибратора KSG 2.

Для проведения количественного анализа:

а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – внести в пробирку 10 мкл РНК-буфера;

б) калибраторы KSG1 и KSG2 – внести в две пробирки по 10 мкл калибратора KSG1 и в две пробирки по 10 мкл калибратора KSG2.

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

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

Таблица 1а

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа⁴

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование	95	5 с	–	40
	60	20 с	Green, Yellow, Orange, Red (FAM, JOE, ROX, Cy5)	
	72	15 с	–	

Таблица 1б

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа⁵

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	5 с	–	40
	60	30 с	Green, Yellow, Orange, Red (FAM, JOE, ROX, Cy5)	
	72	15 с	–	

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

⁴ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

По каналу – **FAM/Green** регистрируется накопление продукта амплификации участка **ДНК β -глобинового гена (BKO Glob)**, по каналу **JOE/HEX/Yellow** – **ДНК EBV**, по каналу **ROX/Orange** – **ДНК CMV**, по каналу **Cy5/Red** – **ДНК HHV6**.

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

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

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

Результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК EBV обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее порога цикла положительного результата. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК CMV обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **ROX/Orange** определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее порога цикла положительного результата. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **ДНК HHV6** обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **Cy5/Red** определено значение порогового цикла C_t , не превышающее порога цикла положительного результата. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК EBV** не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow** не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), **ДНК CMV** не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **ROX/Orange** не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), **ДНК HHV6** не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **Cy5/Red** не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию). При этом в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM/Green** для качественного теста значение порогового цикла C_t не должно превышать указанное во вкладыше, а для количественного теста - количество ДНК ВКО Glob должно быть более **2000** копии/реакцию для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и более **500** для слюны, смывов и мазков из ротоглотки.

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

- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) или выше порогового значения C_t по каналу для флуорофора **JOE/HEX/Yellow**, **ROX/Orange** или **Cy5/Red** и по каналу для флуорофора **FAM/Green** для качественного теста значение C_t более указанного во вкладыше, а для количественного теста - количество ДНК

ВКО Glob менее **2000** копий/реакция для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и менее **500** для слюны, смывов и мазков из ротоглотки. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Для клинических образцов, в которых значения *Ct* по каналам JOE/Yellow/HEX, ROX/Orange или Cy5/Red превышают порог, указанный во вкладыше, результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторях. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторях значений – результат считается **сомнительным**.

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

Для количественного теста в случае, если ДНК ВКО Glob менее **2000** копии/реакцию для цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов и менее **500** копий/реакцию для слюны, смывов и мазков из ротоглотки количественный положительный или отрицательный результат считается **недостоверным**.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, ПК, К–, К+, KSG1, KSG2 (см. табл. 2, 3). Для количественного теста результаты по ПК должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Таблица 2
**Результаты для контролей ПЦР-исследования
в качественном формате**

Контроль	Контролируе- мый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		FAM/Green	JOE/HEX/ Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
OK	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+ (для качествен- ного теста)	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

Таблица 3
**Результаты постановки контролей ПЦР-исследования
в количественном формате**

Контроль	Контролируе- мый этап анализа	Результаты амплификации по каналу			
		FAM/Green	JOE/HEX/ Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
OK	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше
К-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
KSG1, KSG2	ПЦР	Определено значение C_t и расчетная концентрация	Определено значение C_t и расчетная концентрация	Определено значение C_t и расчетная концентрация	Определено значение C_t и расчетная концентрация

При экстракции тотальной ДНК из цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов внутренних органов для количественного теста расчет концентрации в логарифмах копий ДНК на стандартное количество клеток (10^6) в контрольных и исследуемых образцах провести по формуле:

для CMV:

ФОРМАТ FRT

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

для EBV:

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

для HHV6:

$$\lg \left\{ \frac{\text{число_копий_ДНК_HHV6_в_ПЦР-пробе}}{\text{число_копий_ДНК_Glob_в_ПЦР-пробе}} \cdot 2^{*10^5} \right\} = \lg \{ \text{копий ДНК HHV6} / 10^5 \text{ клеток} \}$$

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

$$\text{КПДНК} = \text{КДНК} \cdot 100 \text{ (копий/мл)}$$

КДНК - количество копий ДНК EBV в пробе ДНК или количество копий ДНК CMV в пробе ДНК или количество копий ДНК HHV6 в пробе ДНК.

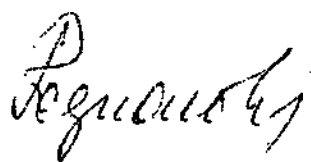
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Главный врач
ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России



С.А. Богдан

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, д. 3А, e-mail: cs@pcr.ru)⁶.

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

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

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

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Изготовитель		



Набор реагентов
для дифференциального выявления
ДНК *Mycoplasma hominis* и
ДНК *Mycoplasma genitalium*
методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 14.02.17

РеалБест ДНК *Mycoplasma hominis* /
Mycoplasma genitalium (комплект 1)

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-0494

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Mycoplasma hominis* / *Mycoplasma genitalium*» предназначен для дифференциального выявления ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинического материала проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100».

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Таq-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Таq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красите-

ля и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 1 пробирка, 1 мл
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ*

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Mycoplasma hominis* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Mycoplasma hominis*

D-0494

5

(СОП 05-2-313), с содержанием ДНК *Mycoplasma hominis* 100 копий в пробе – 100%.

Чувствительность выявления ДНК *Mycoplasma genitalium* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Mycoplasma genitalium* (СОП 05-2-312), с содержанием ДНК *Mycoplasma genitalium* 100 копий в пробе – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Mycoplasma hominis* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Mycoplasma genitalium* (СОП 05-2-312), с содержанием ДНК *Mycoplasma genitalium* 100 копий в пробе – 100%.

Специфичность выявления ДНК *Mycoplasma genitalium* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Mycoplasma hominis* (СОП 05-2-313), с содержанием ДНК *Mycoplasma hominis* 100 копий в пробе – 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Mycoplasma hominis*: клинические испытания, проведенные на 75 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 96,1%–100%, с достоверной вероятностью 90%);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Mycoplasma genitalium*: клинические испытания, проведённые на 48 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 94,0%–100%, с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Mycoplasma hominis*: клинические испытания, проведённые на 112 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 97,4%–100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Mycoplasma genitalium*: клинические испытания, проведённые на 139 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 97,9%–100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (*опасности*) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1–3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Мистраль»; 0,5–2% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: iQ5 iCycler, «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США). «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой («ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °C;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (например, фирма «Eppendorf», Германия);
- встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитропреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «FinnTir», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);

- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Материалом для определения ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* служат соскобы слизистых оболочек урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры).

Подготовку образцов соскобов проводить в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2–8) °C не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18–25) °C не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в целфеновый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2–8) °C составляет 3 месяца.

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °C не более 1 месяца

или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18–24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК возбудителей инфекции и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК возбудителей инфекции:

- «FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

- «HEX» – для регистрации сигнала ДНК *Mycoplasma hominis*;

- «ROX» – для регистрации сигнала ДНК *Mycoplasma genitalium*.

7.7. Запрограммировать положение проби-рок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла Ct ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma hominis* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО.

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «HEX» и каналу «ROX».

Если для ОКО значение Ct по каналу «HEX» и/или «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4).

8.1.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нараста-

D-0494

15

ние сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО.

8.2. Учёт результатов.

8.2.1. Вычислить $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» и «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО превышает значение $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma hominis*, если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» меньше или равно 40.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma*

genitalium, если для этого образца значение *Ct* по каналу «ROX» меньше или равно 40.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

D-0494

17

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики (*потребительские свойства*) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК Мусорпласта hominis/ Мусорпласта genitalium» (комплект 1), следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

*630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,
тел. (383) 332-92-49, 227-60-30;
тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.
E-mail: plkobtk@vector-best.ru*

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ
ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:**

ПРИЛОЖЕНИЕ

**Проведение анализа на приборе «ДТ-96»
(НПО «ДНК-Технология»)**

1. Настройка экспозиции измерений:

В режиме «Работа с прибором» в меню «Настройки» выберите пункт «Экспозиция измерений». В открывшемся окне выберите канал «FAM», измените значение экспозиции на «250», для каналов «HEX» и «ROX» установите значение экспозиции «1000». Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав «ДА».

Внимание! Указанные значения экспозиций применимы только для наборов «Ре-

D-0494

19

алБест» и при необходимости должны быть изменены на исходные.

2. Программирование амплификатора.

2.1. Для создания протокола амплификации нажать кнопку «Создать» во вкладке «Запуск программы амплификации».

2.2. В открывшемся окне выбрать первый шаблон программы амплификации, отредактировать его в соответствии с программой амплификации к используемому набору:

Для наборов «РеалБест ПНК»:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

Для наборов «РеалБест РНК»:

1 стадия: 45 °C – 30 минут;

2 стадия: 94 °C – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

2.3. В ячейке «Имя программы» ввести название созданного протокола амплификации (например, *PCR* и *RT-PCR*) и нажать «ОК». В открывшемся окне указать папку для сохранения файла и нажать «Сохранить».

2.4. В ячейке «Объем рабочей смеси» указать значение «50».

2.5. Во вкладке «Протокол» сначала ввести названия всех образцов, участвующих в постановке, затем заполнить планшет.

Для упрощения заполнения планшета можно создать заготовку, для этого в меню «Тест» выбрать «Создать/редактировать тест», затем «Копировать текущий тест» с именем TEST и присвоить имя новому тесту.

В открывшемся окне в пункте «1.Анализ» выставить тип анализа (*количественный или качественный со стандартами в соответствии с набором*) и метод «Геометрический (Ср)».

Для качественного анализа в пункте «4.Контроли» выставить «1»; для количественного анализа со стандартами (*при постановке с КО1, КО2*) в пункте «3.Стандарты» в ячейке «Количество» выставить «2», в ячейке «2.Дубли» – «3», в пункте «4.Контроли» в ячейке «К⁺» выставить «3», в ячейке «К⁻» – «1». Если поста-

новка без КО1 и КО2, то в пункте «3. Стандарты» в ячейке «Количество» поставить «0».

В пункте «5. Объем рабочей смеси в пробирке» выставить значение «50».

В пункте «6. Флуорофоры» обозначить внутренний контроль (ВК) по каналу «FAM» и специфику по каналу «HEX» или «ROX» в соответствии с инструкцией к набору.

По завершении редактирования нажать «ОК».

В дальнейшем при заполнении протокола следует использовать кнопку «Добавить тест», из списка выбрать нужный для данной постановки и ввести число образцов и контролей.

По окончании заполнения протокола нажать «Применить».

2.6. Программа перейдет на вкладку «Запуск программы амплификации», запустить амплификацию кнопкой «Запуск программы». Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «Запуск программы» в файл с расширением *.r96.

3. Анализ и учёт результатов.

Детекция флуоресценции осуществляется по каналам «FAM» и «ROX» для ДНК ВКО и ДНК возбудителя, соответственно.

Программа автоматически высчитывает пороговое значение флуоресценции по методу «Геометрический (Ср)».

При одновременном выявлении ДНК двух возбудителей ДНК второго возбудителя детектируется по каналу «HEX».

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения <u>п количества тестов</u>		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 33-4-35-90.

14.04.17

**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

**Международный сертификат
ISO 13485**

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

**Тел.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52**

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

**E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru**



Набор реагентов
для выявления ДНК
Chlamydia trachomatis
методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 24.10.2014

РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*
(комплект 1)

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-1998

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*» предназначен для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» и «РеалБест экстракция 100».

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными послед-

довательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР.

Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичных для данных участков ДНК *Chlamydia trachomatis* гибридных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции.

При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в образце ПКО, который подвергается процедуре выделения ДНК вместе с анализируемыми биопробами.

Учёт эффективности выделения ДНК *Chlamydia trachomatis* из образцов обеспечивается выделением ДНК из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизованная – 96 пробирок.

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий ДНК *Chlamydia trachomatis* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов) – 100%.

О-1998

5

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*: клинические испытания, проведённые на 52 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 94%–100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*: клинические испытания, проведённые на 40 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 93%–100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации

нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1–3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Мистраль»; 0,5–2% раствор «Велтолен»).

D-1998

7

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с перемен-

ным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Ленпипет», Россия; фирма «Biohit», Финляндия);

- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитропреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTir», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный);
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» и «РеалБест экстракция 100» согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать при температуре (18–25) °С не менее 30 минут.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2–8) °С не более 2 суток.

ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке (*не вскрывая!*) при температуре (18–25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (*по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО*) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в целфеновый

пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2–8) °C составляет 3 месяца.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis*, ДНК ВКО и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК ВКО:

- для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM».
- для регистрации процесса амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* следует выбрать канал детекции «ROX».

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла Ct ВКО.

8.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

8.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.2. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Chlamydia trachomatis*, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.3. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.4. Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться

*в АО «Вектор-Бест» по адресу:
630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,
тел.: (383) 332-92-49, 327-60-30;
тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;
E-mail: plkobtk@vector-best.ru*

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ
ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:**

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (*утилизируются*) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;
- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;
- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;

- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации;
- Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности;
- Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.
- Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики (*потребительские свойства*) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Проведение анализа на приборе «ДТ-96» (НПО «ДНК-Технология»)

1. Настройка экспозиции измерений:

В режиме «Работа с прибором» в меню «Настройка» выберите пункт «Экспозиция измерений».

В открывшемся окне выберите канал «FAM», измените значение экспозиции на «250», для каналов «HEX» и «ROX» установите значение экспозиции «1000». Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав «ДА».

***Внимание!** Указанные значения экспозиций применимы только для наборов «РеалБест» и при необходимости должны быть изменены на исходные.*

2. Программирование амплификатора:

2.1. Для создания протокола амплификации нажать кнопку «Создать» во вкладке «Запуск программы амплификации».

2.2. В открывшемся окне выбрать первый шаблон программы амплификации, отредактировать его в соответствии с программой амплификации к используемому набору:

Для наборов «РеалБест ДНК»:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

Для наборов «РеалБест РНК»:

1 стадия: 45 °C – 30 минут;

2 стадия: 94 °C – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60° C.

2.3. В ячейке «Имя программы» ввести название созданного протокола амплификации (например, PCR и RT-PCR) и нажать «ОК». В открывшемся окне указать папку для сохранения файла и нажать «сохранить».

2.4. В ячейке «Объем рабочей смеси» указать значение «50».

2.5. Во вкладке «Протокол» сначала ввести названия всех образцов, участвующих в постановке, затем заполнить планшет.

Для упрощения заполнения планшета можно создать заготовку, для этого в меню «Тест» выбрать «Создать / редактировать

тест», затем «Копировать текущий тест» с именем TEST и присвоить имя новому тесту.

В открывшемся окне в пункте «1.Анализ» выставить тип анализа (*количественный или качественный со стандартами в соответствии с набором*) и метод «Геометрический (Ср)».

Для качественного анализа в пункте «4.Контроли» выставить «1»; для количественного анализа со стандартами (*при постановке с КО1, КО2*) в пункте «3.Стандарты» в ячейке «Количество» выставить «2», в ячейке «2.Дубли» – «3», в пункте «4.Контроли» в ячейке «К⁺» выставить «3», в ячейке «К⁻» – «1».

Если постановка без КО1 и КО2, то в пункте «3.Стандарты» в ячейке «Количество» поставить «0».

В пункте «5.Объем рабочей смеси в пробирке» выставить значение «50».

В пункте «6. Флуорофоры» обозначить внутренний контроль (ВК) по каналу «FAM» и специфику по каналу «HEX» или «ROX» в соответствии с инструкцией к набору.

По завершении редактирования нажать «ОК».

В дальнейшем при заполнении протокола следует использовать кнопку «Добавить тест», из списка выбрать нужный для данной поста-

D-1998

новки и ввести число образцов и контролей.

По окончании заполнения протокола нажать «Применить».

2.6. Программа перейдет на вкладку «Запуск программы амплификации», запустить амплификацию кнопкой «Запуск программы». Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «Запуск программы» в файл с расширением *.r96.

3. Анализ и учёт результатов.

Детекция флуоресценции осуществляется по каналам «FAM» и «ROX» для ДНК ВКО и ДНК возбудителя, соответственно.

Программа автоматически высчитывает пороговое значение флуоресценции по методу Геометрический (Ср).

При одновременном выявлении ДНК двух возбудителей ДНК второго возбудителя детектируется по каналу «HEX».

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 33-1-35-90.

10.07.17

D-1998

23

**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

**Международный сертификат
ISO 13485**

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

**Тел.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-62**

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru



Набор реагентов
для выявления ДНК
Ureaplasma urealyticum
методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 20.01.2016

РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum*
(комплект 1)

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-2298

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum*» предназначен для выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100».

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Таq-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Таq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок.

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* определяется по стандартной панели предприятия отрицательных образцов ДНК-экстрактов, СПП (рег. № 05-2-291), как процентное содержание образцов, определённых набором как отрицательные, и составляет 100%.

3.2. Чувствительность определяется по пяти образцам с содержанием ДНК бактерий *Ureaplasma urealyticum* 100 копий в пробе, приготовленным из стандартного образца

предприятия – СОП ДНК бактерий *Ureaplasma urealyticum* (рег. № 05-2-314), как процентное содержание образцов, определённых набором как положительные, и составляет 100%.

3.3. **Диагностическая чувствительность** выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum*: клинические испытания, проведенные на 94 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97%–100%, с доверительной вероятностью 90%);

3.4. **Диагностическая специфичность** выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum*: клинические испытания, проведенные на 94 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97%–100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (*опасности*) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать **одноразовые** медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать **только одноразовые** наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами.

щими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1–3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Мистраль»; 0,5–2% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «iQ5 iCycler», «CFX96» («Bio-Rad», США); «ДТ-96» («НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой («ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;

- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом («Biohit», Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые («NeoTouch», «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTir», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0.2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО универсальный и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

D-2298

9

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать при температуре (18–25) °С не менее 30 минут.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2–8) °С не более 24 часов.

ПКО универсальный после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18–60) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (*не вскрывая!*) при температуре (18–25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (*по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО*) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

Внимание! *Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.*

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2–8) °C составляет 3 месяца.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК *Ureaplasma urealyticum* и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

D-2298

11

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК *Ureaplasma urealyticum*:

- для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM»;
- для регистрации процесса амплификации ДНК *Ureaplasma urealyticum* следует выбрать канал детекции «ROX».

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контрольными образцами согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. В ПКО универсальной программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО.
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Ureaplasma urealyticum* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

8.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при

этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

8.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.2. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Ureaplasma urealyticum*, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.3. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО превышает значение $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

D-2298

9.4. Если для ОКО значение St по каналу «РОХ» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики (*потребительские свойства*) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

*По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:
630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,
тел. (383) 332-92-49, 227-60-30;
тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.
E-mail: plkobtk@vector-best.ru*

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

ПРИЛОЖЕНИЕ

Проведение анализа на приборе «ДТ-96» (НПО «ДНК-Технология»)

1. Настройка экспозиции измерений:

В режиме «Работа с прибором» в меню «Настройки» выберите пункт «Экспозиция измерений».

В открывшемся окне выберите канал «FAM», измените значение экспозиции на «250», для каналов «HEX» и «ROX» установите значение экспозиции «1000». Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав «ДА».

Внимание! Указанные значения экспозиций применимы только для наборов «РеалБест» и при необходимости должны быть изменены на исходные.

2. Программирование усилителя:

2.1. Для создания протокола амплификации нажать кнопку «Создать» во вкладке «Запуск программы амплификации».

2.2. В открывшемся окне выбрать первый шаблон программы амплификации, отредактировать его в соответствии с программой амплификации к используемому набору:

Для наборов «РеалБест ДНК»:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

Для наборов «РеалБест РНК»:

1 стадия: 45 °C – 30 минут;

2 стадия: 94 °C – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

2.3. В ячейке «Имя программы» ввести название созданного протокола амплификации (например, PCR и RT-PCR) и нажать «ОК». В открывшемся окне указать папку для сохранения файла и нажать «сохранить».

2.4. В ячейке «Объём рабочей смеси» указать значение «50».

2.5. Во вкладке «Протокол» сначала ввести названия всех образцов, участвующих в постановке, затем заполнить планшет.

Для упрощения заполнения планшета можно создать заготовку, для этого в меню «Тест» выбрать «Создать / редактировать тест», затем «Копировать текущий тест» с именем TEST и присвоить имя новому тесту.

В открывшемся окне в пункте «1.Анализ» выставить тип анализа (количественный или ка-

качественный со стандартами в соответствии с набором) и метод «Геометрический (Ср)».

Для качественного анализа в пункте «4.Контроли» выставить «1»; для количественного анализа со стандартами (при постановке с КО1, КО2) в пункте «3.Стандарты» в ячейке «Количество» выставить «2», в ячейке «2.Дубли» – «3», в пункте «4.Контроли» в ячейке «К⁺» выставить «3», в ячейке «К⁻» – «1».

Если постановка без КО1 и КО2, то в пункте «3.Стандарты» в ячейке «Количество» поставить «0».

В пункте «5.Объем рабочей смеси в пробирке» выставить значение «50».

В пункте «6. Флуорофоры» обозначить внутренний контроль (ВК) по каналу «FAM» и специфику по каналу «HEX» или «ROX» в соответствии с инструкцией к набору.

По завершении редактирования нажать «ОК».

В дальнейшем при заполнении протокола следует использовать кнопку «Добавить тест», из списка выбрать нужный для данной постановки и ввести число образцов и контролей.

По окончании заполнения протокола нажать «Применить».

2.6. Программа перейдет на вкладку «Запуск программы амплификации», запустить амплификацию кнопкой «Запуск программы». Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «Запуск программы» в файл с расширением *.r96.

3. Анализ и учёт результатов.

Детекция флуоресценции осуществляется по каналам «FAM» и «ROX» для ДНК ВКО и ДНК возбудителя, соответственно.

Программа автоматически высчитывает пороговое значение флуоресценции по методу Геометрический (Ср).

При одновременном выявлении ДНК двух возбудителей ДНК второго возбудителя детектируется по каналу «HEX».

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения Σ количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 334-35-90.

10.07.17

D-2298

19

**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

**Международный сертификат
ISO 13485**

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

**Тел.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52**

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

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

В.Г. Акимкин

2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

**АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* / tox-
genes-FL**

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	5
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	14
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	18
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	18
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	19
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	19
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50)	21
СОСТАВ	21
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	21
А. Подготовка проб для амплификации	21
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ...	22
В. Анализ и интерпретация результатов	23
ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F)	28
СОСТАВ	28
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	31
ФОРМА 3 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)	36
СОСТАВ	36
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	36
А. Подготовка проб для амплификации	36
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ...	37
В. Анализ и интерпретация результатов	38
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	43
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	44
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	45
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	46

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* / *tox-genes-FL*, далее – набор реагентов, предназначен для качественного определения ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и обнаружения генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans* в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мазки с пораженных участков кожи) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала.

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

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания. Набор реагентов может быть использован с целью скрининга носительства *C. diphtheriae*, а также в целях исключения диагноза

«Дифтерия» или постановки предварительного диагноза «Дифтерия». Следует иметь в виду, что некоторые *C.diphtheriae*, имеющие ген токсина, не способны продуцировать токсин (не являются токсигенными). В связи с этим, после получения положительных результатов ПЦР-исследования (обнаружение ДНК *C.diphtheriae* и гена токсина *C.diphtheriae*), токсигенность *C.diphtheriae* необходимо дополнительно подтверждать с использованием других лабораторных методов, в соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на дифтерийную этиологию заболевания (ларинготрахеит, ларингит, круп); от лиц больных ангинами с патологическим выпотом на миндалинах, с подозрением на заглоточный (паратонзиллярный) абсцесс; инфекционный мононуклеоз; стенозирующий ларинготрахеит; от лиц, бывших в контакте с источником инфекции (по эпидемическим показаниям); от лиц, вновь поступающих в специализированные учреждения длительного пребывания для детей и взрослых (с профилактической целью) (Эпидемиологический надзор за дифтерийной инфекцией. Методические указания. МУ 3.1.3018-12).

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 клинко-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 выявляемых микроорганизмов и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов в форме 2 содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридинтрифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

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

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся четыре реакции – амплификация специфических участков ДНК гена *groB* *Corynebacterium diphtheriae*, гена, кодирующего токсин *Corynebacterium diphtheriae*, гена, кодирующего токсин *Corynebacterium ulcerans*, а также ДНК ВКО-FL. Результаты амплификации регистрируются по четырем различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
ДНК-мишень	ДНК ВКО-FL	ДНК токсина <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	ДНК <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	ДНК токсина <i>Corynebacterium ulcerans</i>
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	gene <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>	gene <i>groB</i>	gene <i>tox</i> <i>C. ulcerans</i>

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Форма 3: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1, 2, 3 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-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, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли. Форма 3 рассчитана на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Возбудитель	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность, (предел обнаружения), ГЭ/мл ¹
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, пораженных участков кожи	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50, FRT-100 F, FRT-L	1000
	Ген токсина <i>Corynebacterium diphtheriae</i>			
	Ген токсина <i>Corynebacterium ulcerans</i>			

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

Воспроизводимость исследования

Воспроизводимость исследования была изучена в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах. Тестирование проводили на образцах, содержащих ДНК *C.diphtheriae*, ДНК гена *tox C.diphtheriae* и ДНК гена *tox C.ulcerans*. Конечная концентрация каждого составила 1×10^3 ГЭ/мл. Для всех повторов исследуемых образцов результаты обнаружения заявленных фрагментов ДНК совпали.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает заявленные фрагменты ДНК микроорганизмов при исследовании следующих штаммов из коллекции NCTC® (National Collection of Type Cultures Diphtheriae Reference Laboratory, Central Health Laboratory (CPHL), Великобритания) в концентрации не более 1×10^3 ГЭ/мл:

- *Corynebacterium diphtheriae* NCTC® №10356 (tox-) – ДНК

¹ Количество геномных эквивалентов (ГЭ) микроорганизма в 1 мл исследуемого материала.

- C.diphtheriae* обнаружена, ДНК генов, кодирующих токсины *C.diphtheriae* и *C.ulcerans*, не обнаружена;
- *Corynebacterium diphtheriae* NCTC® №10648 (tox+) – ДНК *C.diphtheriae* и ДНК гена, кодирующего токсин *C.diphtheriae* обнаружена, ДНК гена, кодирующего токсин *C.ulcerans*, не обнаружена;
 - *Corynebacterium ulcerans* NCTC® №7910 (tox+) – ДНК гена, кодирующего токсин *C.ulcerans* обнаружена, ДНК *C.diphtheriae* и гена, кодирующего токсин *C.diphtheriae*, не обнаружена.

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

1. Штаммы из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США) и ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: *Corynebacterium xerosis* ATCC® 7711D-5™, *Corynebacterium urealyticum* ATCC® 43044™, *Corynebacterium amycolatum* ATCC® 49368™, *Corynebacterium jeikeium* ATCC® 43734™, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* 25;
2. Штаммы из коллекций ATCC® (American Type Culture Collection, США), NCTC® (National Collection of Type Cultures, Великобритания) и ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: *Bordetella pertussis* 703 L 6, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619™, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813™, *Streptococcus pyogenes* Dick – I, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC® 15305™, *Haemophilus influenzae* 423, *Proteus mirabilis* 3177, *Klebsiella pneumoniae* 418, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™, *Neisseria flava* ATCC® 14221™, *Neisseria sicca* 5, *Neisseria mucosa* ATCC® 19693™, *Escherichia coli* M 17, *Salmonella enteritidis* 5765, *Salmonella typhimurium* 79, *Moraxella catarrhalis* ATCC® 8193™, *Yersinia enterocolitica* 134, *Enterococcus faecalis* NCTC® 775, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538-P, *Mycobacterium bovis* Ravenel 700204.
3. ДНК человека в концентрации 1 мг/мл.

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

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

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 3

**Результаты тестирования набора реагентов для
диагностики in vitro
АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* / tox-genes-FL
в сравнении с референтным методом**

Тип образцов	Результаты применения АмплиСенс® <i>Corynebacterium diphtheriae</i> / tox-genes-FL		Результаты применения референтного метода ²	
			положительных	отрицательных
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Всего исследовано 300 образцов	положительных	150	0
		отрицательных	0	150
Мазки с пораженных участков кожи	Всего исследовано 300 образцов	положительных	150	0
		отрицательных	0	150

Таблица 4

**Результативность применения набора реагентов для
диагностики in vitro АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* / tox-genes-FL**

Тип образцов	Описание образцов	Количество образцов, шт.	Результат	
			положительных	отрицательных
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Биологический материал, содержащий ДНК <i>C. diphtheriae</i> и гена токсина <i>C. diphtheriae</i>	50	50	0
	Биологический материал, содержащий ДНК <i>C. diphtheriae</i> и не содержащий ДНК гена токсина <i>C. diphtheriae</i>	50	50	0

² В качестве референтного метода использовался Набор реагентов «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» Тест-система биохимическая для дифференциации микроорганизмов рода коринебактерий, в том числе возбудителя дифтерии, и определения его токсигенных свойств по ТУ 9398-061-05941003-2010, РУ № ФСР 2010/07815.

Тип образцов	Описание образцов	Количество образцов, шт.	Результат	
			положительных	отрицательных
	Биологический материал, содержащий ДНК гена токсина <i>C.ulcerans</i>	50	50	0
	Биологический материал, не содержащий ДНК <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена токсина <i>C.diphtheriae</i> и гена токсина <i>C.ulcerans</i>	150	0	150
Мазки с пораженных участков кожи	Биологический материал, содержащий ДНК <i>C.diphtheriae</i> и гена токсина <i>C.diphtheriae</i>	50	50	0
	Биологический материал, содержащий ДНК <i>C.diphtheriae</i> и не содержащий ДНК гена токсина <i>C.diphtheriae</i>	50	50	0
	Биологический материал, содержащий ДНК гена токсина <i>C.ulcerans</i>	50	50	0
	Биологический материал, не содержащий ДНК <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена токсина <i>C.diphtheriae</i> и гена токсина <i>C.ulcerans</i>	150	0	150

Материалом исследования являлись образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки и с пораженных участков кожи, отрицательные при исследовании с набором сравнения, а так же модельные образцы клинического материала, контаминированные штаммами микроорганизмов *Corynebacterium diphtheriae* NCTC® №10356™ (tox-), *Corynebacterium diphtheriae* NCTC® №10648™ (tox+) и *Corynebacterium ulcerans* NCTC® №7910™ (tox+) в концентрации 1×10^3 ГЭ/мл, имитирующие биологический материал от больных дифтерией и носителей возбудителя.

Таблица 5

**Диагностические характеристики набора реагентов для
диагностики in vitro АмплиСенс® *Corynebacterium*
diphtheriae / tox-genes-FL**

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 95 %) в интервале, %	Диагностическая специфичность ⁴ , (с доверительной вероятностью 95 %) в интервале, %
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	92,9 – 100	97,6 – 100
Мазки с пораженных участков кожи	92,9 – 100	97,6 – 100

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

³ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁴ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

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

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать 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 соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

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

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

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Реагент для хранения мазков из полости носа и ротоглотки – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011) или другие, рекомендованные Изготовителем.
2. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или 0,01 М калий-фосфатный буфер, pH 7,0.
3. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия или аналогичный) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
4. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия или аналогичный) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
5. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы) в индивидуальной упаковке, стерильный (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный) – зонд для взятия мазков из ротоглотки у детей и взрослых (допустимо использовать для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6. Комплект реагентов для экстракции ДНК/РНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или другие, рекомендованные Изготовителем.
7. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

8. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» FRT-100 F:
 - 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.
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, 100, 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
10. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
12. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
13. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
14. 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).
15. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
16. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки

по МУ 1.3.2569-09.

17.Емкость для сброса наконечников.

18.ПО для автоматической обработки результатов, зарегистрированное в установленном порядке.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Все работы по взятию, транспортированию и подготовке проб биологического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой оболочки носо- (берутся через нижний носовой ход) и ротоглотки (берутся с поверхности миндалин, небных дужек, задней стенки ротоглотки);
- мазки с пораженных участков кожи.

Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки

Мазки берут разными зондами со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 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 книзу, 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 тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

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

Допускается хранение исследуемого материала до проведения исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки с пораженных участков кожи

Мазки берут сухими стерильными зондами с тампонами. Мазки с пораженной поверхности кожи собирают после предварительного удаления корочки. После взятия материала часть зонда с тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков (или 0,9 % раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатного буфера, pH 7,0). Конец зонда отламывают, 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 исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Мазки со слизистой носо- и ротоглотки, с пораженных участков кожи не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР 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 (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мазки с пораженных участков кожи), используемом для исследования.

Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки

Были протестированы образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки без добавления и с добавлением эндогенных (муцин) и экзогенных (водный раствор хлоргексидина биглюконата для местного и наружного применения, 5 %, и раствор Люголя с глицерином, 1 %) потенциально интерферирующих веществ (см. табл. 6).

Тестирование проводили на образцах мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки с добавлением стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК *C.diphtheriae*, ДНК

гена *tox C.diphtheriae* и ДНК гена *tox C. ulcerans*. Конечная концентрация каждого составила 1×10^4 ГЭ/мл.

Мазки с пораженных участков кожи

Были протестированы мазки с пораженных участков кожи от пациентов с аллергическими неинфекционными дерматозами без добавления и с добавлением эндогенных (гемоглобин) и экзогенных (водный раствор хлоргексидина биглюконата для местного и наружного применения, 5 %) потенциально интерферирующих веществ.

Тестирование проводили на мазках с пораженных участков кожи с добавлением стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК *C.diphtheriae*, ДНК гена *tox C.diphtheriae* и ДНК гена *tox C. ulcerans*. Конечная концентрация каждого составила 1×10^4 ГЭ/мл.

Таблица 6

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Эндогенные вещества	Муцин	5 %	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5 %	Не обнаружено
		Раствор Люголя с глицерином	0,5 %	Не обнаружено
Мазки с пораженных участков кожи	Эндогенные вещества	Гемоглобин	0,21 г/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5 %	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп» в соответствии с инструкцией к данному комплекту.

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 – 100 мкл.

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

Объем элюции – 50 мкл (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 и «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F).

Объем элюции – 100 мкл (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L).

ВНИМАНИЕ! Для элюции при экстракции ДНК из исследуемых образцов используется буфер, входящий в состав комплекта реагентов «РИБО-преп», а так же буфер для элюции, входящий в состав «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L.

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

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>C.diphtheriae</i> / tox genes раскапана под воск	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,01	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-А	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
K+ <i>C.diphtheriae</i> / tox genes	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 55 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 – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL *C.diphtheriae* / tox genes для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 4). Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
2. На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-буфера-А, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с

ПЦР-смесью-FL *C.diphtheriae* / tox genes.

3. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К+ *C.diphtheriae* / tox genes.
 - в) 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. 7).

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

Таблица 7

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁶ и планшетного⁷ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием данной программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, кроме тестов с обратной транскрипцией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала

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

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

назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных.

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

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

Таблица 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК токсина <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , ген <i>tox</i>	ДНК <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , ген <i>rpoB</i>	ДНК токсина <i>Corynebacterium ulcerans</i> , ген <i>tox</i>

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

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген tox <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген proB)	<i>C.ulcerans</i> (ген tox <i>C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	Отсутствует	Определено не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющая ген tox <i>C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющая ген tox <i>C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Отсутствует	Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющая ген, сходный с геном tox <i>C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Определено не больше граничного	НЕ обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i>
Определено не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	ДНК <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена tox <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i> НЕ обнаружены
Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
Определено или отсутствует	Определено больше граничного	Определено не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Определено больше граничного	Определено больше граничного	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Отсутствует	Определено больше граничного	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген, сходный с геном tox <i>C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>groB</i>)	<i>C.ulcerans</i> (ген <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i> и низкое содержание <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> , ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>
<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> в низком содержании

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

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. 10 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

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	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	отсутствует
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 любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 10) 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 каналам для флуорофоров 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 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, и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
4. 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-100 F) СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>C.diphtheriae</i> / tox genes	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
K+ <i>C.diphtheriae</i> / tox genes	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

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 *C.diphtheriae* / tox genes,

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 *C.diphtheriae* / *tox genes*. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-FL *C.diphtheriae* / *tox genes*, ПЦР-буфера-В и 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) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.
 - б) положительный контроль ПЦР (K+) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K+ *C.diphtheriae* / *tox genes*.
 - в) отрицательный контроль ПЦР (K-) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K-.

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. 11).

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

Таблица 11

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁸ и
планшетного⁹ типа**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, 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 возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа 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! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме, с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

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

Таблица 12

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК токсина <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , ген <i>tox</i>	ДНК <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , ген <i>rpoB</i>	ДНК токсина <i>Corynebacterium ulcerans</i> , ген <i>tox</i>

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

Таблица 13

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>C_t</i>)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C. diphtheriae</i> (ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C. diphtheriae</i> (ген <i>rpoB</i>)	<i>C. ulcerans</i> (ген <i>tox</i> <i>C. ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	Отсутствует	Определено не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C. diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C. diphtheriae</i> , имеющая ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C. diphtheriae</i> , имеющая ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox</i> <i>C. ulcerans</i>

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген tox <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген proB)	<i>C.ulcerans</i> (ген tox <i>C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	Отсутствует	Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющая ген, сходный с геном tox <i>C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Определено не больше граничного	НЕ обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i>
Определено не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	ДНК <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена tox <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i> НЕ обнаружены
Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
Определено или отсутствует	Определено больше граничного	Определено не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Определено больше граничного	Определено больше граничного	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Отсутствует	Определено больше граничного	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген, сходный с геном tox <i>C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Определено больше граничного	Отсутствует	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющей ген tox <i>C.diphtheria</i> . Обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген tox <i>C.diphtheriae</i> / низкое содержание <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Определено больше граничного	Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i> , ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген tox <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген rpoB)	<i>C.ulcerans</i> (ген tox <i>C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
				повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген tox <i>C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген tox <i>C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>
<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена tox <i>C.diphtheriae</i> в низком содержании

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

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. 14 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 14

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 14) 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 каналам для флуорофоров JOE и/или ROX, и/или Sy5 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 (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Sy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
4. 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 3 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L) СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участка ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>C.diphtheriae</i> / <i>tox genes</i> -Lyo	Порошок белого цвета	–	96 пробирок объемом 0,2 мл
K+ <i>C.diphtheriae</i> / <i>tox genes</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирок
Буфер для элюции А	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

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

образцов.

3. Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл К+ *C.diphtheriae* / *tox genes*.
- в) 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. 15).

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

Таблица 15

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹⁰ и планшетного¹¹ 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

¹⁰ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

¹¹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

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

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа 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! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

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

Таблица 16

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК токсина <i>Corynebacterium diphtheria</i> , ген <i>tox</i>	ДНК <i>Corynebacterium diphtheria</i> , ген <i>rpoB</i>	ДНК токсина <i>Corynebacterium ulcerans</i> , ген <i>tox</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем

уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 17

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>rpoB</i>)	<i>C.ulcerans</i> (ген <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющая ген <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющая ген <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющая ген, сходный с геном <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	НЕ обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>
<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	ДНК <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i> НЕ обнаружены
Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген tox <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген proB)	<i>C.ulcerans</i> (ген tox <i>C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	Отсутствует	Определено больше граничного	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген, сходный с геном tox <i>C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Определено больше граничного	Отсутствует	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющей ген tox <i>C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген tox <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Определено больше граничного	Определено не больше граничного	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i> , ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Определено не больше граничного	Отсутствует	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген tox <i>C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Определено не больше граничного	Определено больше граничного	Определено не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена tox <i>C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Определено не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген tox <i>C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	Определено не больше граничного	Определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген tox <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Sy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген tox <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген rpoB)	<i>C.ulcerans</i> (ген tox <i>C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено не больше граничного	Отсутствует	Определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>
Определено не больше граничного	Определено больше граничного	Определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена tox <i>C.diphtheriae</i> в низком содержании

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

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. 18 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 18

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			
		FAM	JOE	ROX	Sy5
OK	Экстракция ДНК	определено меньше граничного	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 18) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию

- и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров 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 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, 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, 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.

При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL *C.diphtheriae* / tox genes хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «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 *C.diphtheriae* / tox genes. ПЦР-буфер-В, полимеразу (TaqF) и ПЦР-смесь-FL *C.diphtheriae* / tox genes хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *C.diphtheriae* / tox genes хранить в защищенном от света месте.

Форма 3. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты (ПЦР-смесь *C.diphtheriae* / tox genes-Lyo) хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь *C.diphtheriae* / tox genes-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 установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru¹².

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

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



Е.В. Ржевская

¹² 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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

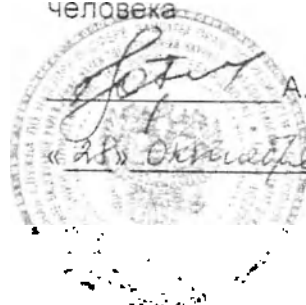
Расчетная таблица приготовления реакционных смесей
для проведения амплификации для комплекта реагентов
«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

		Объем реактивов на указанное количество реакций		
Объем реагента на одну реакцию, мкл		10,0	5,0	0,5
Количество исследуемых образцов	Количество реакций ¹³	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
2	6	60	30	3
4	8	80	40	4
6	10	100	50	5
8	12	120	60	6
10	14	140	70	7
12	16	160	80	8
14	18	180	90	9
16	20	200	100	10
18	22	220	110	11
20	24	240	120	12
22	26	260	130	13
24	28	280	140	14
26	30	300	150	15
28	32	320	160	16
30	34	340	170	17
32	36	360	180	18
68	72	720	360	36
92	96	960	480	48

¹³ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции ДНК (ОК) и 2 контроля этапа ПЦР (К+, К-) + запас на один образец (N+1+2+1, где N- количество исследуемых образцов).

«УТВЕРЖДАЮ»

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



А.В. Горелов

«28» Октября 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для диагностики бактериального вагиноза (определения
концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*,
Lactobacillus spp. и общего количества бактерий) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный
вагиноз-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
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	12
ФОРМАТ FRT	13
СОСТАВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	16
А. Подготовка пробирок для амплификации	16
А1. Подготовка пробирок для амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.....	16
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	18
АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ	19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	22
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	23
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БВ	- бактериальный вагиноз
КС	- коэффициент соотношения
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПКО BV– ПКО BV+	- положительные контрольные образцы этапа экстракции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
TSM	- транспортная среда с муколитиком
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
FC1, FC2	- ДНК-калибраторы
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» предназначен для диагностики бактериального вагиноза методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Набор реагентов позволяет оценить соотношение общего количества бактерий, лактобактерий и условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*) во влагалищном биотопе; общее количество бактерий позволяет оценить адекватность забранного материала. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из отделяемого влагалища и соскоба эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища.

Соотношение логарифмов концентраций *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий, соотношение логарифмов концентраций *Lactobacillus* spp. и условно-патогенной микрофлоры – *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, а также условно-патогенной микрофлоры и общего количества бактерий позволяют с высокой точностью диагностировать бактериальный вагиноз – заболевание, связанное с подавлением нормальной микрофлоры влагалища

(*Lactobacillus* spp.) и заменой ее условно-патогенной (в том числе *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*).

Использование набора реагентов «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» позволяет проводить динамические наблюдения за состоянием влагалищного биотопа и контролировать эффективность проводимой терапии.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения состояния микробиоценоза влагалища (количественное определение ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в клиническом материале) основан на:

- 1) экстракции тотальной ДНК из клинического образца – соскоба эпителиальных клеток со слизистой влагалища или отделяемого влагалища, помещенных в 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (TCM)»;
- 2) одновременном проведении реакции амплификации (мультипрайм-ПЦР) участков ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Для определения количества копий ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в стандартном объеме клинического образца

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

используются количественные стандарты (калибраторы), позволяющие определить число копий ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в реакционной пробирке.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

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

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F.

Форма комплектации 1 предназначена для экстракции ДНК и амплификации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». На этапе экстракции ДНК необходимо использовать дополнительный реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для амплификации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. На этапе экстракции ДНК необходимо использовать дополнительный реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл
Соскоб эпителиальных клеток боковых стенок влагалища	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F	5×10^3
Отделяемое влагалища	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F	5×10^3

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общую бактериальную ДНК. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результатов методом секвенирования фрагментов амплификации.

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и панели образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, HSV 1 и 2 типа, CMV, HPV и ДНК человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-

эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые

наконечники для автоматических дозаторов с фильтром². Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный 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»).
- 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

² Для удаления надосадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

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

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

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

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

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

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

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (флакон объемом 50 мл) (ПУ № ФСР 2009/05514) – при работе с формами комплектации 1–3.
2. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (ПУ № ФСР 2007/00183) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 2–3.

3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплектами» вариант FRT-100 F, FRT-200 F – от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия, Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия), iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) - при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; QIAGEN, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Для проведения анализа используется только клинический материал, полученный от женщин.

Материалом для исследования служит соскобное отделяемое влагалища (соскоб эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища). Получение материала следует производить с помощью универсального зонда или зонда-тампона на пластиковой основе в пробирку объемом 2 мл с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)». Отделяемое следует забирать в достаточном количестве. Погрузить рабочую часть зонда в вагинальное отделяемое задненижнего свода влагалища и, вращая зонд, провести по поверхности эпителия, максимально полно набирая материал на зонд.

Перенести зонд в пробирку с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)». Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить в области насечки и оставить в пробирке с транспортной средой. Недопустимо использование ножниц для отрезания рабочей части зонда. Цвет транспортной среды с муколитиком может измениться за счет изменения pH (при кислом pH отделяемого). Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Возможно исследование самостоятельно забранного материала, проведенное согласно инструкции к «Комплекту для самостоятельного взятия мазка из влагалища для микроскопии и диагностики инфекций методом ПЦР».

Хранение вышеперечисленного материала до проведения исследования осуществляется в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Перед проведением экстракции ДНК необходимо убедиться в том, что зонды оставлены в пробирках с исследуемым материалом, пробирки плотно закрыты, транспортная среда присутствует в пробирках с клиническим материалом в достаточном для проведения исследования объеме (не менее 500 мкл).

Перед проведением экстракции ДНК необходимо разморозить образцы (в случае, если они длительно хранились), затем тщательно встряхнуть пробирки, содержащие исследуемый материал, на вортексе и сбросить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ³	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	FC1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	FC2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

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

ФОРМАТ FRT

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПКО BV+	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО BV-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	FC1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирки
	FC2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирки

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПКО BV+	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО BV-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

К комплекту реагентов также прилагаются:

1. Программное обеспечение «АмплиСенс ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» (в формате Microsoft® Excel) для обработки данных и получения результатов, входящее в

- состав ПО «АмплиСенс Флороценоз», на цифровом носителе или на официальном сайте Изготовителя.
2. Инструкция на бумажном носителе.
 3. Вкладыш со значениями калибраторов и характеристиками контрольных образцов для данной серии набора реагентов.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов для диагностики бактериального вагиноза (определения концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

При работе с формой выпуска набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ».

При работе с формами выпуска набора 1–3 для экстракции ДНК необходимо использовать дополнительный реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) вносится 100 мкл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)». В пробирку положительного контроля экстракции (BV–)

вносится 90 мкл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» и 10 мкл ПКО BV–; в пробирку положительного контроля экстракции (BV+) вносится 90 мкл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» и 10 мкл ПКО BV+.

ВНИМАНИЕ! Добавления внутреннего контрольного образца не требуется!

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

А1. Подготовка пробирок для амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F
Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК– 10 мкл.

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением эксперимента. Смешивать реагенты из расчета расходования на одну реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз;
- 5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).

1. Предварительно необходимо подготовить смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Содержимое одной пробирки с полимеразой (TaqF) (60 мкл) необходимо полностью перенести в пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT (600 мкл) и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на 120 реакций. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть

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

2. Разморозить и встряхнуть на вортексе пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз, сбросить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

Сделать расчет на необходимое число реакций для количественного определения ДНК, включающего тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно расчетной таблице, приведенной в приложении 1. Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку еще 5 контрольных точек этапа амплификации: два ДНК-калибратора (FC1 и FC2) в двух повторах, и отрицательный контроль (ДНК-буфер).

Необходимо брать реагенты с запасом: для тестирования N образцов приготовить реагенты для (N+1) реакций.

3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз и ПЦР-смеси-2-FRT с полимеразой (TaqF), приготовленной согласно п.1.
4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

7. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера;
 - б) ДНК-калибраторы – внести в каждую пробирку по 10 мкл каждого ДНК-калибратора (FC1, FC2);
 - в) отрицательный контроль экстракции ДНК (OK) – внести в пробирку 10 мкл ДНК, выделенной из «Транспортной среды с муколитиком (TCM)»;

ФОРМАТ FRT

- г) положительный контроль экстракции (BV-) – в пробирку внести 10 мкл ДНК, выделенной из ПКО BV-;
- д) положительный контроль экстракции (BV+) – в пробирку внести 10 мкл ДНК, выделенной из ПКО BV+.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1» (см. табл. 1, 2).

Таблица 1

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа⁴

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	-	1
1 Cycling/ Циклирование	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
2 Cycling/ Циклирование	95	5 с	-	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red	
	72	15 с	-	

Таблица 2

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа⁵

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	-	1
2	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
3	95	5 с	-	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	-	

⁴ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

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

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis*;
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Atopobium vaginae*;
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Lactobacillus* spp.;
- по каналу для флуорофора Cy5 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК общего количества бактерий.

Характеристикой сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения кривой накопления флуоресценции и линии порога. Именно значения пороговых циклов анализируются программой автоматического учета результатов. На основании значений порогового цикла (Ct) (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и, исходя из заданных значений калибраторов FC1, FC2, происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов для каждой серии набора реагентов указываются во вкладыше к ПЦР-комплекту и должны быть заданы в соответствующих ячейках

программы автоматической интерпретации результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- Результат амплификации исследуемого образца по каналам **FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red** считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме «реального времени» S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции.
- Результат амплификации исследуемого образца по каналам **FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red** считается **отрицательным** в случае отсутствия кривой типичной S-образной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения C_t).
- Результат анализа образца считается **недостоверным** в случае отсутствия сигнала по каналу **Cy5/Red** или в случае, когда значение Конц.расч. по каналу **Cy5/Red** для исследуемого образца менее 1000 копий на реакцию.
- Результат анализа образца считается **невалидным** в случае отсутствия сигнала по каналу **Cy5/Red** (нет значения C_t) или в случае, когда значение Конц.расч. для исследуемого образца по каналу **ROX/Orange** превышает значение Конц.расч. по каналу **Cy5/Red** более чем на 0,5 L_g .

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Конц.расч. для контрольных образцов указаны во вкладыше, прилагаемом к «ПЦР-комплекту».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, BV–, BV+, K– в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 3), а для калибраторов FC1 и FC2 определено значение C_t .

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу, копий/реакция			
		FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
OK	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
BV-	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение больше граничного	Определено значение больше граничного
BV+	Экстракция ДНК	Определено значение больше граничного	Определено значение больше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение больше граничного
K-	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
FC1, FC2	ПЦР	Определено значение Ct и расчетная концентрация	Определено значение Ct и расчетная концентрация	Определено значение Ct и расчетная концентрация	Определено значение Ct и расчетная концентрация

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Расчет коэффициентов соотношений, на основании которых производится интерпретация полученных данных для исследуемых и контрольных образцов, расчет концентраций ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий, осуществляется автоматически с помощью программы «АмплиСенс Флороценоз / Бактериальный вагиноз-FL» согласно прилагаемой к ней инструкции. Алгоритм получения результатов описан в методических рекомендациях по применению набора реагентов для диагностики бактериального вагиноза (количественное определение ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз хранить в защищенном от света месте.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

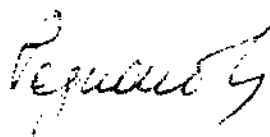
Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru⁶.

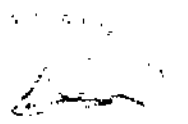
При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение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

Главный врач
ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России



С.А. Богдан

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей

Объем реагентов на одну реакцию (мкл)	Объем реактивов на указанное количество реакций	
	10,0	5,0
Число реакций для количественного определения (включая 3 контроля этапа экстракции)	ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз*	Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)*
4	100	50
5	110	55
6	120	60
7	130	65
8	140	70
9	150	75
10	160	80
11	170	85
12	180	90
13	190	95
14	200	100
15	210	105
16	220	110
17	230	115
18	240	120
19	250	125
20	260	130
21	270	135
22	280	140
23	290	145
24	300	150
25	310	155
30	360	180

* Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки пяти контрольных точек этапа амплификации ((2 ДНК-калибратора FC1, FC2 (по два повтора) и отрицательный контроль ДНК-буфер).

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
LOT	Код партии		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
IVD	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 04.05.2012 № 2126-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И. Покровский
«05» февраля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза
(*Mycobacterium tuberculosis complex*) в клиническом
материале, культурах микроорганизмов и объектах
окружающей среды методом полимеразной цепной реакции
(ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® MTC-FL»

АмплиСенс®



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



СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	14
ФОРМАТ FER	16
СОСТАВ	16
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	18
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	18
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ.....	18
А. Подготовка пробирок для амплификации	18
Б. Проведение амплификации	20
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	20
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	21
ФОРМАТ FRT	25
СОСТАВ	25
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	27
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	27
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	27
А. Подготовка пробирок для амплификации	27
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	28
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	30
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	33
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»	34
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»	36
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-С».....	38
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БАЛ	- бронхо-альвеолярный лаваж
ВКО	- внутренний контрольный образец
ВКО STI-87	- внутренний контрольный образец STI (self-tested inclusion) длиной 87 нуклеотидов для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
К-	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
МБТ (МТС)	- микобактерии туберкулеза (<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>)
м.т.	- микробные тела
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПВБ	- промывные воды бронхов
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
PBS	- фосфатно-солевой буфер
UDG	- фермент UDG – фермент урацил-ДНК-гликозилаза

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® МТС-FL» предназначен для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТС), включающий в себя виды микобактерий разной степени вирулентности, вызывающих туберкулез у человека (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti*, *M.pinipedii*), в разных видах клинического материала, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Обнаружение ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) – *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТС) – методом

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

полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: 1) экстракцию (выделение) тотальной ДНК из образцов клинического материала, парафиновых блоков, культур микроорганизмов или смывов с объектов окружающей среды, а также внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), внесенного в тестируемый образец в начале анализа; 2) одновременную амплификацию фрагмента ДНК *MTC*, т.е. микобактерий туберкулеза, и фрагмента ДНК ВКО; 3) гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (формат FRT), либо после ее завершения с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (формат FER).

Гибридационно-флуоресцентная детекция специфической мишени проводится по каналу FAM/Green (или аналогичному, в зависимости от модели прибора), ВКО – по каналу JOE/Yellow/HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора).

«ПЦР-комплект» варианты FER и FRT, входящие в состав данного набора реагентов, содержат фермент UDG для снижения риска контаминации продуктами амплификации в ПЦР-лабораториях.

С целью оптимизации протоколов исследования микобактерий туберкулеза возможно проведение единой процедуры экстракции ДНК для последующего обнаружения, количественного определения, дифференцирования до вида *M. tuberculosis complex* и определения резистентности к противотуберкулезным препаратам.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах.

Формат FER

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

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

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FER.

Форма 3 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FER.

Формат FER Форма 4: **REF** B57-FER; **REF** H-1074-2; Формат FRT Форма 4: **REF** R-B57(RG,iQ,SC,Di96);
REF H-1074-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 4 из 41

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP.

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

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК и амплификацию ДНК *МТС* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 4 предназначена для проведения амплификации ДНК *МТС* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

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

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 3 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

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

Формы комплектации 1, 2, 3 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК и амплификацию ДНК *МТС* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 4 предназначена для проведения амплификации ДНК МТС с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, м.т./мл
			<i>M.tuberculosis</i> (штамм H37 Ra)
PBS-буфер, мокрота, бронхо-альвеолярный лаваж	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	5×10^2
Моча		«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	1×10^3
Смывы с объектов окружающей среды ²		«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	$2,5 \times 10^2$ копий/мл
PBS-буфер, мокрота	«ДНК-сорб-В»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	5×10^2
Бронхоальвеолярный лаваж, моча		«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	1×10^3
Смывы с объектов окружающей среды ²		«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	$2,5 \times 10^2$ копий/мл
10% гомогенат разных видов тканей (легкие, лимфатические узлы, почки, печень, мозг, селезенка)	«ДНК-сорб-С»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	1×10^2

² Допускается проведение исследования без этапа экстракции ДНК при добавлении образца смывов с объектов окружающей среды непосредственно в реакционную смесь для проведения ПЦР-исследования.

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность оценивалась как при тестировании штаммов микобактерий входящих в группу *M.tuberculosis complex*, так и нетуберкулезных микобактерий, а также штаммов микроорганизмов, вызывающих заболевания сходных локализаций.

Для определения аналитической специфичности на штаммах различных микроорганизмов (в концентрации не менее, чем 5×10^8 м.т./мл), тестировали 67 контрольных штаммов или клинических изолятов. Из них 16 входили в состав группы *M.tuberculosis complex*, 23 являлись нетуберкулезными микобактериями, 28 принадлежали к другим родам и семействам. Специфичность набора реагентов оценивалась по отсутствию положительного результата амплификации ДНК бактерий, не принадлежащих к *M.tuberculosis complex*, а также по наличию положительного результата у бактерий, входящих в состав этой группы.

Перечень референтных штаммов и клинических изолятов:

- Микобактерии, принадлежащие к группе *Mycobacterium tuberculosis complex*: *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG и др.
- Нетуберкулезные микобактерии: *M.avium*, *M.fortuitum*, *M.gordoniae*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.marinum*, *M.paratuberculosis*, *M.phlei*, *M.scrofulaceum*, *M.smegmatis*, *M.xenopi*, *M.ulcerans*, *M.terrae* и др.
- Бактерии, принадлежащие к другим родам и семействам: *Brucella abortus*, *B.melitensis*, *B.ovis*, *B.suis*; *Campylobacter jejuni*; *Chlamydia suis*; *Chlamydophila abortus*, *Ch.felis*; *Cryptococcus neoformans*; *Enterobacter cloacae*, *E.faecalis*; *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Listeria monocytogenes*; *Moraxella catarrhalis*; *Neisseria cinerea*, *N.elongata*, *N.flava*, *N.gonor*, *N.mucosa*, *N.sicca*, *N.subflava*, *N.pantoea agglomerans*; *Pasteurella tularensis*; *Proteus vulgaris*, *P.mirabilis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella enteritidis*, *S.typhi*; *Shigella flexneri*, *Sh.sonne*; *Staphylococcus aureus*, различные клинические изоляты *S.aureus* MRSA, *S.faecalis*, *S.saprophyticus*; *S.Streptococcus* A, B, C, G, *S.oralis*, *S.pneumonia*.

Результаты тестирования показали 100 % специфичность как для набора реагентов в варианте FRT, так и в варианте FEP.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе в лабораториях противотуберкулезных учреждений следует дополнительно руководствоваться требованиями Приказа № 109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» (Приложение №11).

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Инфицированный материал, а также одноразовая пластиковая посуда, соприкасавшаяся с инфицированным материалом, должна сбрасываться на 120 мин в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2% раствор ДП-2Т, на 180 мин в 0,3 % раствор жавелиона или использовать другие хлорсодержащие дезинфицирующие средства.
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным.

Формат FEP Форма 4: **REF** B57-FEP; **REF** H-1074-2; Формат FRT Форма 4: **REF** R-B57(RG,IQ,SC,DI96);
REF H-1074-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 8 из 41

Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1. Экстракция ДНК из клинического материала

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008), «ДНК-сорб-С» (ТУ 9398-075-01897593-2008) или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 4 (формат FEP и формат FRT).
2. Ламинарный бокс (класс биологической безопасности тип II А для лабораторий ПЦР в составе клиничко-диагностических лабораторий или тип II В для лабораторий ПЦР в составе противотуберкулезных учреждений).

Формат FEP Форма 4: **REF** B57-FEP; **REF** H-1074-2; Формат FRT Форма 4: **REF** R-B57(RG,IQ,SC,D196);
REF H-1074-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 9 из 41

3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g.
5. Центрифуга/вортекс.
6. Гомогенизатор для тканевых образцов (например, гомогенизатор TissueLyser LT, Qiagen, Германия, центрифуга/вортекс «Мультиспин MSC-6000» с ротором RC-1.5, BioSan, Латвия) или фарфоровые ступки с пестиками.
7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
8. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема.
9. Механический дозатор переменного объема 1-5 мл.
10. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
11. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся конические пробирки с петлей объемом 2,0 мл (для работы с центрифугой/вортексом «Мультиспин MSC-6000»).
12. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся конические свободно-стоящие пробирки с объемом 2,0 мл (например, № 72.694.100, Sarstedt, Германия) (для работы с гомогенизатором TissueLyser LT, Qiagen, Германия).
13. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 (200) мкл и до 1000 мкл.
14. Одноразовые наконечники для дозаторов до 5000 мкл.
15. Штативы для наконечников.
16. Стекланные или фарфоровые шарики, стерильные, для гомогенизации мокроты (D=3-5 мм) и тканевого материала (D=3 мм).
17. Металлические шарики, стерильные, для гомогенизации тканевого материала (D=5-7 мм).
18. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
19. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.

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

1. ПЦР-бокс.
2. Центрифуга/вортекс.

3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема.
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 (200) мкл.
5. Штативы для наконечников и пробирок на 0,5 (0,2) мл.
6. 2 холодильника от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С, соответственно для хранения образцов ДНК и реагентов.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость с крышкой для дезинфицирующего раствора.
9. Персональный компьютер для работы с амплификатором (формат FRT) или флуоресцентным ПЦР-детектором (формат FEP).

При работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP:

10. Программируемый амплификатор (например, MaxyGene (Axygen Scientific, США), «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
11. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» и «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
12. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл для амплификаторов, адаптированных под пробирки указанного объема (например, GeneAmp PCR System 2700, MaxyGene) или объемом 0,5 мл для амплификаторов, адаптированных под пробирки указанного объема (например, «Терцик»).

При работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT:

13. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000, (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ или iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P, Mx3005 (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и SmartCycler II в комплекте со специальной центрифугой Mini-Spin (фирмы Cepheid, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

14. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл для приборов формата ПЦР режиме «реальном времени» с детекцией через дно пробирки (например, Rotor-Gene для постановки в ротор на 36 пробирок) или с куполообразной крышкой на 0,2 мл для приборов формата ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через крышку (например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3005, «ДТ-96») или специальные реакционные модули для прибора SmartCycler II.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Взятие материала

1. **Бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов (ПВБ),** ликвор собирают в одноразовые плотно закрывающиеся емкости из полипропилена (во избежание адгезии клеток на внутренней поверхности емкости) объемом не менее 5 мл.
2. **Мокроту, мочу (среднюю порцию)** собирают в одноразовые градуированные закрывающиеся емкости с широким горлом объемом не менее 50 мл.
3. **Кровь, плевральную жидкость** собирают в пробирки типа Vacuette® с раствором или напылением ЭДТА. Закрытую пробирку с материалом несколько раз переворачивают, чтобы перемешать консервант. Для анализа используют цельную кровь, собранную у пациента утром натощак.
4. **Менструальную кровь** собирают с помощью колпачка Кафка, собранную кровь переносят в сухую одноразовую пробирку.
5. **Синовиальную жидкость** собирают в сухую одноразовую пробирку.
6. **Секрет предстательной железы** получают одним из двух способов:
 - а) После окончания массажа предстательной железы ее секрет собирают в одноразовую стерильную пробирку объемом 1,5 мл;
 - б) При невозможности получить секрет – сразу после массажа собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы).

Формат FEP Форма 4: **REF** B57-FEP; **REF** H-1074-2; Формат FRT Форма 4: **REF** R-B57(RG,iQ,SC,Dt96);

REF H-1074-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 12 из 41

7. Тканевой (биопсийный и операционный) материал помещают в пробирки типа Vacuette® с напылением раствора ЭДТА или в одноразовую пробирку, содержащую 0,2 мл стерильного физиологического раствора.
8. Парафиновые блоки нарезают на микротоме или вырезают фрагмент ткани одноразовым скальпелем, удаляют парафин с помощью ксилола, а затем освобождаются от ксилола серией отмывок с понижающейся концентрацией этанола (аналогично стандартной гистологической проводке).
9. Культуры микроорганизмов, выросшие на селективных для микобактерий туберкулеза питательных средах:
 - а) Плотной - переносят колонии в стеклянные пробирки аналогично работе со стандартом мутности, ресуспендируя в стерильном физиологическом растворе или PBS-буфере.
 - б) Жидкой - используют оригинальный флакон.
10. Смывы с объектов окружающей среды берут зондами с тампонами, смоченными стерильным физиологическим раствором. Площадь смыва с плоской поверхности составляет 5-10 см². Рабочую часть зонда с тампоном помещают в пробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора, верхнюю часть зонда отламывают и удаляют.

Хранение материала (в случае отсроченного выполнения анализа, резервирования материала для возможной перестановки, а также хранения архивных образцов) возможно по следующей схеме: предполагаемое хранение в течение 3 сут (кроме мочи) – допускается температура от 2 до 8 °С; хранение не более 1 года - допускается температура не выше минус 16 °С; архивирование образцов на срок более 1 года – температура не должна превышать минус 68 °С. Мочу хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 6 ч, в дальнейшем – замораживать. Кровь не замораживают. Допускается двукратное замораживание-оттаивание остального клинического материала.

Транспортирование материала осуществляют в термоконтейнере с хладагентом не более 3 сут.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

1. Бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов (ПВБ) перемешать переворачиванием в исходной емкости. Автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отобрать 1 мл образца, поместить в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф», промаркировать ее и центрифугировать 10 мин при 10 тыс g. Затем аккуратно удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, оставляя 100 мкл образца.
2. В емкость с мокротой добавить «Муколизин» (реагент производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для предобработки мокроты) в соотношении 1:5, ориентируясь по градуировке емкости и стерильные фарфоровые или стеклянные шарики в количестве 3-5 штук. В процессе разжижения мокроты (20-30 мин) емкость необходимо периодически встряхивать. Затем автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отобрать 100 мкл материала, поместить в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф» и промаркировать ее.
3. Мочу перемешать переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отобрать 5-10 мл образца, поместить в завинчивающуюся пробирку, промаркировать ее и центрифугировать 10 мин при 10 тыс g. В случае отсутствия в лаборатории высокоскоростной центрифуги применять центрифугирование в режиме 3 тыс g x 20 мин. Затем аккуратно, с помощью вакуумного отсасывателя, удалить надосадочную жидкость до осадка, в случае если осадок не виден – оставить 100 мкл образца.
4. В синовиальную жидкость добавить объем «Муколизина» (реагент производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для предобработки мокроты) в соотношении 1:1, в процессе разжижения материала (20-30 мин) пробирку необходимо периодически встряхивать.
5. Поместить тканевой материал в одноразовую чашку Петри, одноразовым скальпелем отделить фрагмент объемом не более 10 мм³ (10 мкл). При использовании центрифуги/вортекса «Мультиспин MSC-6000» (12 гнезд) перенести фрагменты ткани в одноразовые

Формат FEP Форма 4: **REF** B57-FEP; **REF** H-1074-2; Формат FRT Форма 4: **REF** R-B57(RG,IQ,SC,Dt96);
REF H-1074-1 / **VER** 15.02.12 / стр. 14 из 41

полипропиленовые заворачивающиеся конические пробирки с петлей объемом 2,0 мл, положить в них по 2-3 стерильных стеклянных шарика. При использовании гомогенизатора TissueLyser LT фрагменты ткани перенести в одноразовые заворачивающиеся пробирки объемом 2,0 мл, положить в них по 1-2 металлических шарика. В случае использования фарфоровых ступок с пестиками поместить в ступку образец ткани и добавить равный объем PBS-буфера или стерильного физиологического раствора и гомогенизировать образец.

6. Колонии микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде (ППСр) ресуспендировать в стерильном физиологическом растворе (или PBS-буфере), используя стандарт мутности №5 (5×10^8 м.т./мл) или McFarland № 0,5, 1 или 2. Для исследования используют 5 мкл суспензии. При исследовании культуры, выросшей на жидкой питательной среде (ЖПСр) отобрать аликвоту объемом 1 мл и центрифугировать 10 мин при 1 тыс g, затем удалить надосадочную жидкость.
7. Смывы с объектов окружающей среды – для исследования используется 100 мкл раствора.

Таблица 1

Объем проб, используемый для пробоподготовки и экстракции ДНК

Вид материала	Объем аликвоты для пробоподготовки	Объем аликвоты для экстракции ДНК
Мокрота	весь образец	0,1 мл
БАЛ или ПVB	1 мл	0,1 мл
Моча	5-10 мл	0,1 мл
Ликвор	1 мл	0,1 мл
Синовиальная жидкость	1 мл	0,1 мл
Секрет простаты	1 мл	0,1 мл
ППСр	$1,5-6 \times 10^8$ м.т./мл	0,05 мл
ЖПСр	1 мл	0,1 мл
Кровь	0,1 мл	
Менструальная кровь	0,1 мл	
Ткань	10-25 мкл	
Смывы с объектов окружающей среды	0,1 мл	

Необходимо предусмотреть возможное повторное выделение пробы и резервировать аликвоту образца согласно правилам хранения материала.

ФОРМАТ FEP

ФОРМАТ FEP

СОСТАВ

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ³	15	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ³	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

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

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

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

Комплект реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала, продуктов питания и кормов для животных – включает:

³ При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса, буфера для лизирующего реагента и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FEP

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Буфер для лизирующего реагента	Прозрачная бесцветная жидкость ³	20	1 флакон
Лизирующий реагент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,85	1 пробирка
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ³	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
TE-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP MTC	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	2 пробирки
ПЦР-буфер-Flu	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
Фермент UDG	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК MTC / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
TE-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

ФОРМАТ FEP

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
РНК-буфер ⁴	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов:

- «ДНК-сорб-В» для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды;
- «РИБО-преп» для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды;
- «ДНК-сорб-С» для экстракции ДНК из тканей человека.

Детальная информация по их использованию изложена в Приложениях 1, 2, 3 к данной инструкции.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

⁴ Пробирка с РНК-буфером используется для элюции при экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп».

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

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл для амплификации исследуемых, контрольных (один контроль экстракции, два контроля амплификации) и фоновых пробирок (2 пробирки «Фон»).
2. Приготовить образцы «Фон». Для каждого из образцов смешать по 10 мкл ПЦР-смеси-1-FEP *MTC* и по 15 мкл ПЦР-смеси-Фон. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
3. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить реакционную смесь из расчета по 10 мкл ПЦР-смеси-1-FEP *MTC*, 5 мкл ПЦР-буфера-Flu, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,5 мкл Фермента UDG на одну реакцию. Полученную реакционную смесь перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
4. В подготовленные пробирки для амплификации исследуемых и контрольных проб внести по 15 мкл подготовленной реакционной смеси.
5. На поверхность реакционной смеси всех пробирок, включая контрольные и фоновые, добавить по капле минерального масла для ПЦР (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. При добавлении проб ДНК при использовании «ДНК-сорб-В» и «ДНК-сорб-С» необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (K-) – внести в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (K+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *MTC* / *STI*.

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

ВНИМАНИЕ! Для проведения деконтаминации реакционной смеси необходимо инкубировать полностью подготовленные для проведения ПЦР-исследования пробирки 10–30 мин при комнатной температуре.

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации. Программы амплификации «65 МТС» для амплификаторов с активным и матричным регулированием указаны в табл. 2.
2. Поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить на амплификаторе выполнение программы термоциклирования.

Таблица 2

Программы амплификации «65 МТС»

Для амплификаторов с активным регулированием ⁵				Для амплификаторов с матричным регулированием ⁶			
Цикл	Температура, °C	Время	Циклов	Цикл	Температура, °C	Время	Циклов
1	95	15 мин	1	1	95	15 мин	1
2	95	15 с	45	2	95	20 с	45
	65	20 с			65	20 с	
	72	15 с			72	20 с	
3	10	Хранение		3	10	Хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели

⁵ Например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cycler (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, США).

⁶ Например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), MaxyGene (Axygen Scientific, США), PTC-100 (MJ Research), T-personal (Biometra, Германия).

- прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации специфической мишени.
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ВКО.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к «ПЦР-комплекту», а также методические рекомендации по применению набора реагентов для обнаружения микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*) в клиническом материале, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® МТС-FL» формат FEP, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

1. Для канала FAM, измеряющего сигнал для специфической мишени, предусмотрена опция 2 пороговых значений – положительного и отрицательного результатов, для канала HEX – единственного порога.
2. Значения ниже порогового значения отрицательного результата принимаются отрицательными, выше порогового значения положительного результата – положительными, между порогами – сомнительными.
3. При получении сомнительного результата детекции требуется повторное проведение анализа данного образца – повторная амплификация, а в случае повторного получения сомнительного результата – повторная экстракция ДНК.

Интерпретация результатов в контрольных образцах

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

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		Обозначение результата в программах некоторых детекторов
		FAM	HEX	
OK	Экстракция ДНК, ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Выше</u> порогового значения	«-» или «OK»
K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения	«нд»
K+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения	«+» или «OK»

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал FAM ниже порогового значения положительного результата или по каналу HEX ниже порогового значения, необходимо повторно провести анализ для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, а также для положительного контроля ПЦР (K+), начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналу FAM выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex*, а также для этого/этих контролей, начиная с этапа экстракции ДНК.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах

Таблица 4

Интерпретация результатов исследуемых образцов

FAM	HEX	Валидность результата	Форма выдачи ответа
<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	валидный	<i>M. tuberculosis complex</i> обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Выше</u> порогового значения	валидный	<i>M. tuberculosis complex</i> не обнаружена
Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения	невалидный	сомнительный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала
<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения	невалидный	невалидный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала

В случае получения сигнала:

- Выше порогового значения положительного результата по каналу FAM и выше или ниже порогового значения по каналу HEX – результат валидный - в образце исследуемого материала *M. tuberculosis complex* обнаружена.
- Ниже порогового значения отрицательного результата по каналу FAM и выше порогового значения по каналу HEX – результат валидный - в образце исследуемого материала *M. tuberculosis complex* не обнаружена.
- Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата по каналу FAM и ниже порогового значения по каналу HEX – результат невалидный. Требуется повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как сомнительный, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.
- Ниже порогового значения отрицательного результата по

ФОРМАТ FEP

каналу FAM и ниже порогового значения по каналу HEX – результат невалидный. Требуется повторная амплификация образца, и в случае повторного получения аналогичного результата, необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как **невалидный**, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ⁷	15	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ⁷	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ⁷	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

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

Комплект реагентов «ДНК-сорб-С» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала, продуктов питания и кормов для животных – включает:

⁷ При хранении лизирующего раствора, раствора для лизиса, буфера для лизирующего реагента и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Буфер для лизирующего реагента	Прозрачная бесцветная жидкость ⁷	20	1 флакон
Лизирующий реагент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,85	1 пробирка
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ⁷	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT MTC	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	2 пробирки
ПЦР-буфер-Flu	Прозрачная бесцветная жидкость	0,28	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
Фермент UDG	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК MTC / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,6	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

ФОРМАТ FRT

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
РНК-буфер ⁸	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Используются наборы реагентов:

- «ДНК-сорб-В» для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды,
- «РИБО-преп» для экстракции ДНК из образцов клинического материала, культур микроорганизмов и объектов окружающей среды,
- «ДНК-сорб-С» для экстракции ДНК из тканей человека.

Детальная информация по их использованию изложена в приложениях 1, 2, 3 к данной инструкции.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок, стрипов или плашек 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.

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе все реагенты набора и осадить капли с крышек пробирок. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

1. Отобрать необходимое количество пробирок для

⁸ Пробирка с РНК-буфером используется для элюции при экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп».

амплификации с учетом количества исследуемых и контрольных (один контроль экстракции, два контроля амплификации).

2. В пробирке объемом 1,5 мл приготовить реакционную смесь из расчета по 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *МТС*, 5 мкл ПЦР-буфера-Flu, 0,5 мкл полимеразы (TaqF) и 0,5 мкл Фермента UDG на одну реакцию. Полученную реакционную смесь перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
3. Внести в каждую пробирку по 15 мкл подготовленной реакционной смеси.
4. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. При добавлении проб ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
5. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *МТС / STI*.

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

ВНИМАНИЕ! Для проведения деконтаминации реакционной смеси инкубировать полностью подготовленные для проведения ПЦР-анализа пробирки 10 – 30 мин при комнатной температуре.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5, 6, 7).

Таблица 5

Программа амплификации «95-65-72 МТС» для приборов роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия))

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	—	1
2	95	15 с	—	5
	65	30 с	—	
	72	15 с	—	
3	95	15 с	—	40
	65	30 с	FAM, JOE, ROX, Cy5 ⁹	
	72	15 с	—	

Таблица 6

Программа амплификации «95-65-72 МТС» для приборов планшетного типа (например, iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия))

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	—	1
2	95	15 с	—	5
	65	30 с	—	
	72	15 с	—	
3	95	15 с	—	40
	65	30 с	FAM, JOE, ROX, Cy5 ¹⁰	
	72	15 с	—	

Таблица 7

Программа амплификации «95-65-72 МТС» для прибора SmartCycler II (Cepheid, США)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	—	1
2	95	20 с	—	45
	65	50 с	Optics ON	
	72	20 с	—	

⁹ Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

Измерение флуоресценции по каналам ROX и Cy5 не производится при работе на двухканальных приборах, или если в лаборатории не предполагается использование тестов для количественного определения и дифференцирования до вида *Mycobacterium tuberculosis complex*.

¹⁰ Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

Измерение флуоресценции по каналам ROX и Cy5 не производится при работе на двухканальных приборах, или если в лаборатории не предполагается использование тестов для количественного определения и дифференцирования до вида *Mycobacterium tuberculosis complex*.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

См. также **методические рекомендации** по применению набора реагентов для обнаружения микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis complex*) в клиническом материале, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MTC-FL» вариант FRT ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам – анализируются после окончания работы амплификатора с помощью программного обеспечения используемого прибора, используя установки, указанные во вкладыше к «ПЦР-комплекту» для соответствующего прибора.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла (Ct или Cp) в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, и значение порогового цикла (Ct или Cp) для данного канала менее указанного, **отрицательным** – в случае отсутствия кривой типичной формы, не пересекающейся с пороговой линией (нет значения Ct или Cp), **сомнительным** во всех остальных случаях.

Положительный результат по каналу FAM¹¹ свидетельствует

¹¹ Или аналогичный в зависимости от прибора: Green/FAM/FAM-490, Yellow/JOE/JOE-530/HEX, Orange/ROX/ROX-575, Red/Cy5/Cy5-635.

о наличии в образце ДНК *M.tuberculosis complex*, по каналу JOE¹¹ – об адекватном прохождении этапов экстракции и амплификации ВКО.

Оценка результатов анализа контрольных точек.

Результат считается достоверным только в случае соответствия прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК данным таблицы (см. табл. 8).

Таблица 8

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результат амплификации по каналу	
		FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	отрицательный	положительный
K+	ПЦР	положительный	положительный
K–	ПЦР	отрицательный	отрицательный

Результаты не подлежат учету в случае:

1. Отсутствия положительного сигнала по каналам FAM или JOE в пробе с положительным контролем ПЦР (K+), что может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации или о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В этом случае требуется повторная амплификация всех отрицательных образцов, при повторном получении аналогичного результата, необходимо повторить исследование этих образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Наличие положительного сигнала по каналу FAM в одном из отрицательных контролей (OK или K–), что может свидетельствовать о контаминации реактивов или исследуемых образцов. В этом случае необходимо повторить исследование для всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Отсутствия положительного сигнала по каналу JOE в контрольном образце экстракции (OK), что может свидетельствовать об ошибках на этапе экстракции ДНК. В этом случае необходимо повторить анализ образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

Принцип интерпретации результатов, полученных для исследуемых образцов:

Таблица 9

Интерпретация результатов исследуемых образцов

FAM	JOE	Валидность результата	Форма выдачи ответа
Положительный	Положительный / отрицательный	Валидный	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> обнаружена
Отрицательный	Положительный	Валидный	<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> не обнаружена
Отрицательный / > Ct*	Отрицательный / > Ct*	Невалидный	Невалидный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала
> Ct*	Положительный	Невалидный	Сомнительный, рекомендуется повторное взятие и исследование материала

* значение > Ct для конкретного прибора см. во Вкладыше к ПЦР-комплекту для соответствующего прибора.

В случае получения:

1. Положительного результата по каналу FAM и положительного или отрицательного результата по каналу JOE – результат валидный – *Mycobacterium tuberculosis complex* обнаружена.
2. Отрицательного результата по каналу FAM и положительного – по каналу JOE – результат валидный – *Mycobacterium tuberculosis complex* не обнаружена.
3. Отрицательного результата или результата > Ct* (для конкретного прибора) по каналам FAM и JOE свидетельствует о невалидном результате. Требуется повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как невалидный, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.
4. Результата > Ct* по каналу FAM и положительного – по каналу JOE – результат невалидный. Требуется повторная амплификация образца, в случае повторного получения аналогичного результата, необходимо повторить анализ образца, начиная с этапа экстракции ДНК. Если валидный результат не получен, то образец интерпретируется как сомнительный, при этом рекомендуется повторное взятие и исследование материала.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

Хранение. Комплекты реагентов «ДНК-сорб-В» и «ДНК-сорб-С» (кроме лизирующего реагента) хранить при температуре от 2 до 25 °С. Лизирующий реагент хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «РИБО-преп» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (TaqF), ПЦР-смесь-1-FER MTC, ПЦР-смесь-1-FRT MTC и фермент UDG (из «ПЦР-комплекта») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FER MTC и ПЦР-смесь-1-FRT MTC хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® MTC-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)¹².

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Е.Я. Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

¹² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»

Порядок работы

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить пробирку **отрицательного контроля** экстракции (ОК) и внести в нее **100 мкл ОКО**, используя наконечники с фильтром.
3. В одноразовую пробирку объемом от 5 мл внести **лизирующий раствор и ВКО STI-87** из расчета по **300** и по **10 мкл** на пробу соответственно (необходимо также учитывать пробу отрицательного контроля экстракции), перемешать пипетированием. Внести в каждую пробирку с клиническими и контрольным образцами по **310 мкл смеси**, используя наконечники с фильтром.
4. Все образцы тщательно перемешать на вортексе, затем центрифугировать на микроцентрифуге в течение 30 с при 10 тыс g для удаления капель с крышек пробирок.
5. При экстракции ДНК из мочи смесь **лизирующего раствора и ВКО STI-87** внести в центрифужные пробирки с осадком материала, ресуспендировать отдельным наконечником с фильтром для каждого образца и перенести в пробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф».
6. Все образцы прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Если образец растворился не полностью, процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс g и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новую пробирку.
7. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, оставить в штативе на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
8. Осадить **сорбент универсальный** в пробирках центрифугированием при 5 тыс. g в течение 30 с. Удалить

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

- надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
9. Добавить в образцы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс. g на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
 10. Добавить в образцы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 10 тыс. g на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
 11. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 10, удалить надосадочную жидкость полностью.
 12. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального, при этом крышки пробирок должны быть открыты.
 13. В пробирки добавить по **100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
 14. Центрифугировать пробирки при 12 тыс g в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Образцы готовы к постановке ПЦР. Пробы переносить аккуратно, не взбалтывая сорбент универсальный.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы

1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) и внести в нее 100 мкл ОКО, используя наконечники с фильтром.
3. В одноразовую пробирку объемом от 5 мл внести раствор для лизиса и ВКО STI-87 из расчета по 300 и по 10 мкл на пробу соответственно (необходимо также учитывать пробу отрицательного контроля экстракции), перемешать пипетированием. Внести в каждую пробирку с клиническими и контрольным образцами по 310 мкл смеси, используя наконечники с фильтром.
4. Все образцы тщательно перемешать на вортексе, затем центрифугировать на микроцентрифуге в течение 30 с при 10 тыс g для удаления капель с крышек пробирок.
5. При экстракции ДНК из мочи смесь раствора для лизиса и ВКО STI-87 внести в центрифужные пробирки с осадком материала, ресуспендировать отдельным наконечником с фильтром для каждого образца и перенести в пробирки объемом 1,5 мл типа «Эппендорф».
6. Содержимое пробирок прогреть 5 мин при 60 °С в термостате, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки.
7. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешать на вортексе.
8. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 12 тыс g.
9. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

11. Центрифугировать при 12 тыс g в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.
12. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
13. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
14. Центрифугировать при 12 тыс g в течение 2 мин на микроцентрифуге.
15. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
16. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °C на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
17. Добавить в пробирки по 100 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 60 °C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
18. Центрифугировать пробирки при 12 тыс g в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные ДНК и РНК. Образцы готовы к постановке ПЦР.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Экстракция ДНК из образцов исследуемого материала при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-С»

Порядок работы

1. Буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-65 °С до полного растворения кристаллов.
2. В одноразовую пробирку объемом от 5 мл внести по 400 мкл буфера для лизирующего реагента, по 17 мкл лизирующего реагента и по 10 мкл ВКО STI-87 на каждую пробу соответственно (необходимо также учитывать пробу отрицательного контроля экстракции), перемешать пипетированием.
3. При использовании центрифуги/вортекса «Мультиспин MSC-6000» или гомогенизатора TissueLyser LT:
 - а) Подготовить полипропиленовые заворачивающиеся конические пробирки с петлей объемом 2,0 мл или свободностоящие объемом 2,0 мл, соответственно.
 - б) В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОКО, используя наконечники с фильтром.
 - в) Внести в каждую из подготовленных пробирок с фрагментами ткани и шариками, а также в пробирку ОК, по 425 мкл смеси отдельными наконечниками с фильтром.
 - г) Поместить пробирки в ротор центрифуги/вортекса «Мультиспин MSC-6000» и установить следующий режим:

RPm	Vortex	Cycle
1000	hard	140
0,01	20	stop

или в ротор гомогенизатора и установить режим: частота 50 Гц, время 2 мин.

- д) Перенести пробирки в термостат и провести инкубирование образцов при температуре 65 °С в течение 10 мин.
4. При использовании фарфоровых ступок для гомогенизации образца ткани:

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

- а) Подготовить полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.
 - б) В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОКО, используя наконечники с фильтром.
 - в) Перенести из ступки в пробирки 20 мкл гомогенизированного образца.
 - г) Инкубировать образцы при температуре 65 °С в течение 1 ч, периодически встряхивая на вортексе (не менее 5 раз).
 - д) Осадить нерастворенные частицы образцов центрифугированием при 12 тыс g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость в объеме 350 мкл очень аккуратно отобрать отдельными наконечниками с фильтром и перенести в новые пробирки объемом 1,5 мл.
5. Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, оставить в штативе на 10–15 мин, перемешивая через каждые 2 мин.
6. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс g в течение 1 мин. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
7. Добавить в образцы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс g на микроцентрифуге в течение 1 мин. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.
8. Добавить в образцы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 1 мин при 10 тыс g на микроцентрифуге. Отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждого образца.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

9. Повторить процедуру отмывки раствором для отмывки 2, отобрать надосадочную жидкость полностью.
10. Поместить пробирки в термостат при температуре 64 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
11. В пробирки добавить по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 64 °C на 5–8 мин, периодически (1 раз в мин) встряхивая на вортексе.
12. Процентрифугировать пробирки при 12 тыс g в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (проба ДНК). Образцы готовы к постановке ПЦР.

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
	Код партии		Максимальное число тестов
	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 26.07.12 № 16/12-147/12

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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL»

АмплиСенс®



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	10
СОСТАВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	14
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	14
А. Подготовка пробирок для амплификации	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	15
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	16
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	19
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- преп»	20
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
В-	- отрицательный контроль экстракции
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК)
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL» предназначен для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в клещах, биологическом материале от людей (кровь, мокрота, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал) и материале от животных (кровь, секционный материал, плацента и абортный материал) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.¹

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Coxiella burnetii* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT). Экстракция ДНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами проводится реакция амплификации участка ДНК *Coxiella burnetii* при помощи специфичных к этому

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

участку ДНК праймеров и фермента TaqF-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствует флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов при использовании формата FRT происходит непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК *Coxiella burnetii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК *Coxiella burnetii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала (объем исследуемой пробы)	Комплект для выделения РНК/ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность ² , ГЭ/мл	Пробоподготовка материала
-клещи рода <i>Dermacentor</i> (50 мкл клещевой суспензии); -кровь (лейкоцитарная фракция крови, 200 мкл); -10 % суспензия тканей селезенки и печени (50 мкл)	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 ³	Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом исследуемом объеме пробы

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на бактериях *Rickettsia conorii* ssp. *Caspia*, *Ehrlichia muris* и *Francisella tularensis*, а также вирусах – вирусе Западного Нила, вирусе Крымской-Конго геморрагической лихорадки и *Herpesvirus*.

При работе с РНК/ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, а также ДНК человека, ДНК клещей и ДНК грызунов не выявлено ложноположительных результатов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Взятие, хранение материала, транспортирование на исследование и работу с ним проводят в соответствии с инструктивно-методическими документами, регламентирующими выполнение исследований: СП 1.3. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», МУ 1.3.2569-09 «Организация

² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца исследуемого материала.

работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

При работе необходимо выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как потенциально инфекционные и работать с ними в биологическом кабинете в соответствии СП 1.3. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)»
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Уничтожать образцы в соответствии с СП 1.3. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)»

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой

- и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. 0,15 М NaCl (физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2) для проведения пробоподготовки клещей, тканей внутренних органов, секционного материала.
2. 96 % раствор этанола для проведения пробоподготовки клещей, обработанных маслом.
3. Глицерин для проведения пробоподготовки клещей.
4. Гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия) и металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 5 мм и 7 мм рекомендуются для гомогенизации тканей органов и клещей.
5. Стерильные фарфоровая ступка и пестик для пробоподготовки внутренних органов и секционного материала.
6. Реагент «МУКОЛИЗИН» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для предварительной обработки мокроты.

ЗОНА 1. Экстракция ДНК из биологического материала.

7. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) – при работе с формой комплектации 1.
8. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
9. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
10. Автоматические дозаторы переменного объема (от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл).
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
12. Штатив для пробирок объемом 1,5 мл.
13. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 1000 мкл.
14. Штативы для наконечников.

15. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс g.
16. Вортекс.
17. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
18. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
19. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.
20. Емкость для сброса наконечников.

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

21. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
22. Центрифуга/вортекс.
23. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл, от 20 до 200 мкл).
24. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
25. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
26. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
27. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.
28. Емкость для сброса наконечников.
29. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
30. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США) или пробирки

для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Осуществляется в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г, а также СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат:

- Иксодовые клещи: *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Ixodes*.

Материал от людей:

- Цельная периферическая кровь, мокрота, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал (ткани мозга, сердца, легких, селезенка).

Материал от животных:

- кровь, плацента, абортивный материал, секционный материал (селезенка).

Кровь, мокроту, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал доставляют в лабораторию в емкости со льдом в течение 1 сут.

При поступлении в лабораторию проводят пробоподготовку крови, ликвора, промывных вод бронхов с получением бактериального осадка, после чего либо сразу приступают к экстракции нуклеиновых кислот либо замораживают пробу для длительного хранения. Клещей хранят или живыми (до 1 мес), или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре не выше минус 68 °С. Секционный и абортивный материал, а также плаценту хранят 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

1. Клещи

Клещей предпочтительнее исследовать индивидуально. В том случае, если клещи были обработаны маслом, их следует поместить в пробирки типа «Эппендорф», добавить 500 мкл 96 % этанола и встряхнуть на вортексе. Пробирку центрифугировать в течение 3-5 с на микроцентрифуге типа вортекс для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки, после чего жидкость аккуратно отобрать с помощью вакуумного отсасывателя. Затем в пробирку с клещами добавить 500 мкл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида или PBS-буфера, встряхнуть на вортексе, центрифугировать в течение 3-5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки, после чего жидкость аккуратно отобрать с помощью вакуумного отсасывателя. Для приготовления суспензий клещей использовать стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применять следующие параметры гомогенизации: 1) для клещей родов *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* и *Dermacentor* диаметр шариков 7 мм, частота 50 Гц/с, время гомогенизации 10–12 мин, объем буфера 700 мкл (ненапитавшийся клещ) или 1000-1500 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей); 2) для клещей рода *Ixodes* диаметр шариков 5 мм, частота 50 Гц/с, время гомогенизации 5–10 мин, объем буфера 300 мкл (ненапитавшийся клещ) или 700-1000 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей).

В случае гомогенизации напитавшихся клещей в ступке их предварительно следует проколоть стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей растирать в 700 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща родов *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*) или в 300 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща рода *Ixodes*), в 1-1,5 мл (если гомогенизируют пул клещей или напитавшегося клеща родов *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*), или в 1000 мкл (если гомогенизируют пул клещей или напитавшегося клеща рода *Ixodes*) 0,15 М раствора хлорида натрия, смешивая

раствор с клещами небольшими объемами, затем полученную суспензию центрифугировать при 5 тыс об/мин в течение 2 мин и отобрать 50 мкл надосадочной жидкости для экстракции ДНК. Оставшийся объем суспензии без осадка перенести в новую пробирку типа «Эппендорф» и внести глицерин (10 % по объему), пробу перемешать и заморозить при температуре не выше минус 16 °С для последующего исследования.

2. Кровь

Взятие цельной периферической крови у людей проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА в соотношении 1:20. Закрытую пробирку несколько раз переворачивают. В пробирку типа «Эппендорф» внести 1,5 мл цельной крови, взятой с ЭДТА, и центрифугировать при 800 об/мин (380 g при диаметре ротора 50 мм) в течение 10 мин; затем верхний слой плазмы (500-600 мкл) с лейкоцитами перенести во вторую пробирку типа «Эппендорф» и центрифугировать при 9 000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (за исключением 200 мкл жидкости над осадком клеток) перенести в контейнер с дезинфицирующим раствором, а осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости использовать для экстракции ДНК.

3. Внутренние органы, плацента и абортивный материал от животных, секционный материал, полученный от человека

Кусочки объемом не менее 0,5 см³ тщательно растереть в гомогенизаторах или с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавить стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида или PBS-буфер не менее 500 мкл и тщательно перемешать. При подготовке плаценты гомогенизаторы использовать не рекомендуется. Готовую 10 % суспензию отстаивать при комнатной температуре в течение 2–3 мин, затем верхнюю фазу перенести в пробирки вместимостью 1,5 мл. ДНК выделяют из 50 мкл суспензии.

4. Мокрота

Предобработку материала выполнять по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Для экстракции ДНК использовать 50 мкл пробы.

5. Ликвор и промывные воды бронхов

1,0 мл клинического образца перенести в пробирку типа

«Эппендорф» и центрифугировать при 9 000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (за исключением 200 мкл жидкости над осадком клеток) перенести в контейнер с дезинфицирующим раствором, а осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости использовать для экстракции ДНК.

Материал после пробоподготовки до экстракции ДНК можно хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение 1 мес или длительно при температуре не выше минус 68 °С.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

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

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Coxiella burnetii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Coxiella burnetii</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Coxiella burnetii</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87).

При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» порядок работы см. в приложении 1 «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций. При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается амплификацией как минимум

трех контрольных образцов: отрицательного контроля экстракции (В–), положительного и отрицательного контролей ПЦР (К+ и К–). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше.

2. В отдельной пробирке необходимо смешать **ПЦР-смесь-1-FRT *Coxiella burnetii*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**, полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию:
 - 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *Coxiella burnetii*;
 - 5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT;
 - 0,5 мкл полимеразы (TaqF).
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
4. Внести в каждую пробирку по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь не хранить!

5. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКД ДНК *Coxiella burnetii* / STI.
 - в) отрицательный контроль экстракции (В–) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из (В–).

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси с пробами ДНК и контролями!

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

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

Таблица 1

Цикл	Приборы роторного типа ⁴			Приборы планшетного типа ⁵		
	Температура	Время	Кол-во циклов	Температура	Время	Кол-во циклов
1	95 °C	15 мин	1	95 °C	15 мин	1
2	95 °C	5 с	5	95 °C	5 с	5
	60 °C	20 с		60 °C	25 с	
	72 °C	15 с		72 °C	15 с	
3	95 °C	5 с	40	95 °C	5 с	40
	56 °C	20 с детекция флуоресц. Сигнала		56 °C	25 с детекция флуоресц. Сигнала	
	72 °C	15 с		72 °C	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE.

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК BKO STI-87,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Coxiella burnetii*.

⁴ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁵ Например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

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

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК

В соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Coxiella burnetii*.
3. Если для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам FAM и/или JOE определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Coxiella burnetii*, с постановкой «К–» не менее чем в трех повторях.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁶.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач Областной инфекционной
клинической больницы им. А.М. Ничоги

А.В. Буркин

г. Астрахань

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

Экстракция ДНК из всех видов биологического материала проводится с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»

Порядок работы.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. **В случае экстракции ДНК из суспензий клещей и тканей, мокроты** отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку, предназначенную для экстракции исследуемых проб, по 10 мкл ВКО STI-87 и по 300 мкл раствора для лизиса. Промаркировать пробирки.
2. В пробирки с раствором для лизиса и ВКО STI-87 внести по 50 мкл суспензий клещей, суспензий тканей и обработанной муколизином мокроты.
3. **В случае экстракции ДНК из осадков клеток крови, ликвора, промывных вод бронхов** в пробирки с пробоподготовленным материалом внести по 300 мкл раствора для лизиса. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и процентрифугировать на вортексе для удаления капель с крышки пробирки. В пробирки с исследуемыми пробами внести по 10 мкл ВКО STI-87. Промаркировать пробирки.
4. В пробирку отрицательного контроля (В-) экстракции внести только 10 мкл ВКО STI-87 и 300 мкл раствора для лизиса.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 10 000 g.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

8. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Процентрифугировать при 10 000 g в течение 2 мин на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Процентрифугировать при 10 000 g в течение 2 мин на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °C на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при 10 000 g в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР. Очищенная ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °C и до года при температуре не выше минус 16 °C.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное
число тестов



Изделие для *in vitro*
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата
изготовления



Производитель

«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

«28» *января* 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению тест-системы «ЛПС» для выявления патогенных лептоспир методом полимеразной цепной реакции

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «ЛПС» предназначена для выявления 16S РНК патогенных лептоспир в биологическом материале от животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод выявления 16S РНК патогенных геновидов лептоспир основан на экстракции РНК из образцов исследуемого материала совместно с РНК экзогенного внутреннего контрольного образца (ВКО-V), проведении реакции обратной транскрипции РНК, амплификации полученной кДНК и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами РНК

проводится обратная транскрипция РНК с помощью фермента Реввертазы (MMIV) и амплификация участков кДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы.

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой кДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции.

Результаты амплификации регистрируются по следующим каналам флуоресцентной детекции (см. табл. 1):

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
кДНК-мишень	кДНК ВКО-V	кДНК <i>Leptospira</i>

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данной тест-системы применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения, limit of detection, LOD)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
Кровь, ткани внутренних органов, моча	«РИБО-золь-С» + «РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5×10^3
Кровь, моча	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5×10^3

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Порядок отбора и подготовки проб».

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность тест-системы доказана при исследовании следующих микроорганизмов: сапрофитный вид *Leptospira biflexa*, *Treponema pallidum*, *Borrelia garinii*, *B. afzelii*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae*; *Brucella suis*; *B. abortus*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. melitensis*, *Chlamydia suis*; *Chlamydophila pecorum*, *Ch. abortus*, *Ch. felis*; *Haemophilus*

parasuis; *Lawsonia intracellularis*; *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Bordetella bronchiseptica*; *Pasterella multocida*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium bovis*, *M.tuberculosis*, *M.avium*; *Escherichia coli*; *Campylobacter jejuni*; *Salmonella choleraesuis*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, а также образцов ДНК человека, свиньи, КРС, собаки, кошки, овцы.

При тестировании образцов вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека, свиньи, КРС, собаки, кошки, овцы неспецифических реакций выявлено не было.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Форма 1 предназначена для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК, рекомендованные Изготовителем.

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

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК участка 16S РНК патогенных лептоспир с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Объем, мл	Количество
ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT <i>Leptospira</i>	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	0,03	1 пробирка
ТМ-Реввертаза (MMIv)	0,015	1 пробирка
RT-G-mix-2	0,01	2 пробирки
ПКО кДНК <i>Leptospira</i>	0,1	1 пробирка
К-	0,2	1 пробирка
ОКО	1,6	2 пробирки
ПКО <i>Leptospira-rec</i>	0,03	5 пробирок
ВКО-V	0,6	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.

Допускается другая фасовка, согласованная в установленном порядке.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Работа должна проводиться согласно правилам МСХиП РФ 27.01.1997 г. № 13-7-2/840 «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения», утвержденным Департаментом ветеринарии.
- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания отходов.
- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты), использованные для гомогенизации, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор

¹ Для удаления жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Тест-система предназначена для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Тест-система готова к применению согласно данной инструкции. Применять тест-систему строго по назначению.
- Не использовать тест-систему, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать тест-систему 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. Вредно при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Тест-систему хранить в местах, не доступных для детей.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку², биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в

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

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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом от 1,5 до 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
2. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
3. Вакуумная система забора крови (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичные).

Предварительная подготовка исследуемого материала

4. 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; pH=7,5±0,2).
5. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
6. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
8. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
9. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого

материала.

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

Экстракция РНК из исследуемых образцов

14. Комплект реагентов для экстракции РНК – «РИБО-преп» или «Рибо-золь-С» совместно с «Рибо-сорб».
15. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК.

Обратная транскрипция и амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

16. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
 - 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) – при использовании прибора роторного типа.
17. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
18. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
19. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные

- системы», Россия, или аналогичный).
20. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 21. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 22. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
 23. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
 24. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.
 25. Емкость для сброса наконечников.

ПОРЯДОК ОТБОРА И ПОДГОТОВКИ ПРОБ

Материалом для исследования служат: кровь, моча, тканевой (аутопсийный) материал (ткани мозга, легких, почек), культуры бактерий.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала

При взятии материала используют отдельные инструменты для каждого животного.

Взятие крови проводится в стерильные пробирки с 3 %-ным раствором ЭДТА из расчета 10:1 (или с цитратом натрия в стандартной концентрации). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Моча собирается в стерильную посуду.

Тканевой (аутопсийный) материал (фрагменты органов) помещают в стерильный пластиковый контейнер.

Материалы доставляют в лабораторию в течение суток, сохраняя при температуре от 2 до 8 °C. Допускается хранение образцов цельной крови при температуре от 2 до 8 °C – не более 48 часов, замораживание цельной крови не допускается. Для остальных материалов (за исключением мочи) допускается хранение:

- при температуре от 2 до 8 °C – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение

1 месяца;

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

Если нет возможности исследовать мочу в течение 24 ч после взятия, она переносится в центрифужную пробирку на 30 мл или «Эппендорф», затем в нее вносят глицерин, 10 % от объема пробы, перемешивают для равномерного распределения глицерина и замораживают при температуре не выше минус 16 °С для хранения в течение 1 месяца или при температуре не выше минус 68 °С в течение более длительного времени.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК

Для получения бактериальной фракции крови пробирку с кровью центрифугируют в течение 10 мин при 1000 g (если кровь стояла при температуре от 2 до 8 °С более 1 ч после ее забора, то пробирку следует аккуратно несколько раз перевернуть для равномерного перемешивания крови). Затем отбирают две пробирки по 1 мл плазмы и центрифугируют ее при 10 000 g в течение 10 мин для концентрирования бактериальных клеток. После этого 900 мкл надосадочной плазмы удаляют наконечником с фильтром в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 100 мкл надосадочной жидкости исследуются на наличие 16S РНК лептоспир. Аналогичным образом приготовленный второй осадок хранится при температуре не выше минус 16 °С для повторной экстракции в случае нарушения какого-либо из технологических процессов.

Для исследования мочи используют несколько алгоритмов пробоподготовки.

При наличии центрифуги с охлаждением до 4 °С для пробирок объемом 30 мл и ускорением 9-10 тыс g используется следующий алгоритм пробоподготовки.

Пробу центрифугируют при 9-10 тыс g в течение 10 мин, затем надосадочную жидкость переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, оставив в пробирке осадок и 1 мл надосадочной жидкости, после чего осадок ресуспендируют в оставшемся 1 мл надосадочной жидкости и переносят в отдельную пробирку. После чего снова

концентрируют пробу при 10 000 g в течение 10 мин. 900 мкл надосадочной жидкости переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 100 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции РНК. В случае наличия большого количества солей или слизи, для экстракции РНК в отдельную пробирку переносят 100 мкл надосадочной жидкости и верхний слой клеток, аккуратно снятый с осадка солей.

При отсутствии центрифуги для пробирок объемом 30 мл и ускорением 9-10 тыс g, проводят концентрирование бактерий только из 1 мл мочи как описано выше, используя пробирки на 1,5 мл и центрифугу для пробирок типа «Эппендорф».

Внутренние органы гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, или автоматических гомогенизаторов для биоматериала, затем готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Для экстракции РНК берут 30 мкл суспензии.

Культуры бактерий разводят в 1000 раз стерильным физиологическим раствором или фосфатным буфером. Для экстракции РНК используют 100 мкл полученного разведения.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК и амплификация кДНК (ОТ-ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

Для экстракции РНК используются:

- а) «РИБО-преп» – экстракция РНК из крови, осадков мочи, содержащих только эпителиальные клетки и не содержащих соли, культур бактерий;
- б) «РИБО-золь-С» – первый этап экстракции РНК из крови, суспензий тканей внутренних органов, осадков мочи (в том числе содержащих соли), культур бактерий. Второй этап экстракции РНК проводится с использованием комплекта «РИБО-сорб».

А. Экстракция РНК при помощи комплекта реагентов «РИБО-преп»

ВНИМАНИЕ! Для работы с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

В случае экстракции РНК из гомогенатов тканей отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО-V. Добавить в пробирки по 300 мкл раствора для лизиса. Промаркировать пробирки.

В пробирки с раствором для лизиса и ВКО-V внести по 50 мкл исследуемых суспензий.

При экстракции из осадков клеток после концентрирования лептоспир непосредственно в исследуемые пробирки с осадками необходимо внести 300 мкл раствора для лизиса и 10 мкл ВКО-V.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) вносят только 10 мкл ВКО-V и 300 мкл раствора для лизиса.

В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести 300 мкл раствора для лизиса, затем добавить 90 мкл ОКО, 10 мкл ВКО-V и 10 мкл ПКО *Leptospira-rec*.

Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при 65 °С в термостате.

Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешать на вортексе.

Процентрифугировать пробирки на центрифуге в течение 5 мин при 13 тыс об/мин.

Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим

штативом, прижать их и переворачивать штатив.

Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 2 мин на центрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 2 мин на центрифуге.

Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

Добавить в пробирки по 40 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на центрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Б. Экстракция РНК при помощи комплектов реагентов «РИБО-золь-С» и «РИБО-сорб»

I этап

В пробирки с исследуемыми осадками крови или мочи, или с тканевым гомогенатом внести по 300 мкл раствора D, затем добавить 10 мкл ВКО-V. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 300 мкл раствора D, затем добавить 10 мкл ВКО-V и 100 мкл ОКО. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести 300 мкл раствора D, затем добавить 90 мкл ОКО, 10 мкл ВКО-V и 10 мкл ПКО *Leptospira*-гес. После чего пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть при температуре 56 °С в течение 5 мин, несколько раз перемешивая. После этого пробы необходимо центрифугировать в течение 5 с на вортексе для удаления

капель с внутренней поверхности крышки пробирки. В случае исследования суспензий тканей органов можно на первом этапе в пустые пробирки внести **300 мкл раствора D**, **10 мкл ВКО-V** и затем по **30 мкл** исследуемой пробы.

Добавить к образцам, лизированным в растворе D, **30 мкл раствора E**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с для сбрасывания капель с крышки пробирки.

В пробирки добавить **300 мкл раствора A**, перемешать на вортексе и центрифугировать 5 с на вортексе для сбрасывания капель с крышки пробирки.

В пробирки добавить **100 мкл раствора B**, перемешать на вортексе в течение 1-2 мин (раствор должен стать молочно-белым), затем поместить пробы на ледяную баню (при температуре от 0 до 4 °C) на 10 мин. После этого центрифугировать пробирки в течение 10 мин при 10 тыс g.

В новые пробирки объемом 1,5 мл внести по **400 мкл лизирующего раствора** и промаркировать соответственно номерам проб.

После центрифугирования раствор должен разделиться на 2 фазы: нижнюю (фенольную), содержащую белки и ДНК, и верхнюю (водную), содержащую РНК. Необходимо аккуратно отобрать верхнюю фазу (400 мкл при экстракции РНК из осадков мочи и гомогенатов внутренних органов, 200 мкл – из осадков крови, 450 мкл при экстракции РНК из ОКО и ПКО), не захватывая нижний слой, и перенести ее в пробирку с лизирующим раствором. Тщательно перемешать смесь.

II этап

Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.

Центрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 7 тыс об/мин в течение 30 с на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 7 тыс об/мин на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя

вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 45 с при 9 тыс об/мин на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

Повторить отмывку раствором для отмывки 3.

Добавить в пробирки по 400 мкл раствора для отмывки 4. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 1 мин при 10 тыс об/мин на центрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.

Поместить пробирки в термостат при температуре 56 °C на 10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

В пробирки добавить по 40 мкл РНК-буфера, используя свободный от РНКаз наконечник с фильтром. Перемешать содержимое пробирок на вортексе. Поместить в термостат при температуре 56 °C на 5 мин (встряхивая пробы на вортексе каждую минуту). Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (13 тыс об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Обратная транскрипция, амплификация и детекция продуктов амплификации

Общий объем реакции – 25 мкл, объем РНК-пробы – 10 мкл.

Порядок работы:

А. Подготовка проб для проведения ОТ-ПЦР

Пробирку с ОТ-ПЦР-смесью-1-FRT *Leptospira* разморозить, перемешать на вортексе и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Leptospira*, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMIv) и RT-G-mix-2 из расчета на каждую реакцию:

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

Перемешать смесь на вортексе, осадить кратковременным центрифугированием и внести по 15 мкл для ОТ-ПЦР.

Используя наконечник с фильтром, в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл проб РНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

Поставить контрольные реакции:

- а) отрицательный контроль ОТ-ПЦР (К–) – внести в пробирку 10 мкл К–.
- б) положительный контроль ОТ-ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО кДНК *Leptospira*.

Б. Проведение обратной транскрипции, амплификации и детекции продуктов амплификации

Порядок работы с помощью приборов Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) смотрите в Приложении 1.

Порядок работы с помощью приборов iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) смотрите в Приложении 2.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Тест-система 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. Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ОТ-ПЦР-смеси-1-FRT *Leptospira*, ПЦР-буфера-С, полимеразы (TaqF), ТМ-Ревертазы (MMlv) и RT-G-mix-2. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Leptospira*, ПЦР-буфер-С, полимеразу (TaqF), ТМ-Ревертазу (MMlv) и RT-G-mix-2 хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ОТ-ПЦР-смесь-1-FRT *Leptospira* 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 тест-системы требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество тест-системы «ЛПС» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru³.

³ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, («Киаген ГмбХ»), Германия)

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

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

А. Проведение ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и запустить программу Rotor-Gene.

Поместить подготовленные для проведения ОТ-ПЦР пробирки в ротор амплификатора, начиная с ячейки номер 1 (ячейки ротора пронумерованы, эти номера используются в дальнейшем для программирования положения проб в амплификаторе), установить ротор в прибор, закрыть крышку. Запрограммировать прибор.

ВНИМАНИЕ! Лунка 1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой (*не пустой*).

- Нажать кнопку **New/Новый** в основном меню программы. Для создания шаблона в открывшемся окне **New Run/Новый тест** следует выбрать вкладку **Advanced/Детальный мастер**.
- Во вкладке выбрать шаблон запуска эксперимента **TwoStep/Hidrolysis Probes/Двухшаговый цикл**. Нажать кнопку **New/Новый**.
- Выбрать тип ротора. Поставить отметку в окошке рядом с надписью **No Domed 0.2 ml Tubes/Locking ring attached/Кольцо закреплено**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.

- Выбрать объем реакционной смеси: **Reaction volume/Объем реакции** – 25 мкл. Для прибора Rotor-Gene 6000 должно быть отмечено окошко **15 μ l oil layer volume/15 μ L объем масла/воска**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**.
- В верхней части окна нажать кнопку **Edit profile/Редактор профиля**.
- Задать следующие параметры эксперимента:

Таблица 3

Программа амплификации *Leptospira*

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Hold 1/ Удерж. темп-ры 1	50	30 мин	–	1
Hold 2/ Удерж. темп-ры 2	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование 1	95	20с	–	10
	65	50с	–	
	72	20с	–	
Cycling 2/ Циклирование 2	95	20с	–	38
	61	50 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	20 с	–	

Нажать дважды кнопку **OK/Да**.

- В нижней части окна нажать кнопку **Calibrate/Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.** В открывшемся окне нажать кнопку **Calibrate Acquiring/Optimise Acquiring/Onm. Демек-мых**, выбрать функцию **Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimisation Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**. Для канала FAM/Green установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 3FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 7FI. Для канала JOE/Yellow установить параметры **Min Reading/Миним. Сигнал** – 10FI и **Max Reading/Максим. Сигнал** – 20FI (активировать **Edit.../Правка...**, окно **Auto gain calibration channel settings/Авто-оптимизация уровня сигнала**). Окно закрыть, нажав кнопку **Close/Заккрыть**.
- Нажать кнопку **Next/Далее**, запустить амплификацию кнопкой **Start run/Старт**.
- Дать название эксперименту и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты

данного эксперимента).

В процессе работы амплификатора или по окончании его работы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Для этого надо использовать кнопку **Edit samples/Правка образцов** (в нижней правой части основного окна). Все исследуемые образцы обозначить как **Unknown/Образец**, положительные контроли – **Positive control/Положительный контроль**, отрицательный контроль экстракции – **Negative control/Отрицательный контроль**, отрицательный контроль ОТ-ПЦР – **NTC/ОТР. (ПФ)**. Для ячеек, соответствующих пустым пробиркам, установить тип **None/Пусто**.

Б. Анализ результатов

Анализ результатов по каналу JOE/Yellow:

- Нажать в меню кнопки **Analysis/Анализ**, выбрать режим анализа **Quantitation/Количественный**, нажать кнопку **Cycling A. JOE/Cycling A. Yellow, Show/Показать**.
- Отменить автоматический выбор **Threshold/Порог**.
- В меню основного окна (**Quantitation analysis/Количественный анализ**) должны быть активированы кнопки **Dynamic tube/Динамич.фон** и **Slope Correct/Коррект.уклона**.
- Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку **Linear scale/Линейная шкала**, в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки **Linear scale/Линейная шкала** видна кнопка **Log scale/Лог.шкала**).
- В меню основного окна **More settings/Outlier Removal/Устранение выбросов** установить значение **NTC threshold/Порог Фона – ПФ (NTC) – 10 %**.
- В меню **CT Calculation/Вычисление CT** (в правой части окна) выставить **Threshold/Порог = 0.04**.

В таблице результатов (окно **Quant. Results/Количественные Результаты**) появятся значения **Ct**.

Анализ результатов по каналу FAM/Green провести аналогично анализу результатов по каналу JOE/Yellow в соответствии с настройками, указанными в таблице ниже.

Таблица 4

Канал	Threshold/ Порог	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	More Settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов
FAM/Green	0,03	включена	включена	10%
JOE/Yellow	0,04	включена	включена	10%

В. Интерпретация результатов

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) значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 5

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла (Ct) по каналу			Результат
FAM/Green		JOE/Yellow	
Осадки крови и бактериальных культур	Гомогенаты тканей и осадки мочи		
≤ 25	≤ 27	отсутствует	РНК патогенных лептоспир НЕ обнаружена
определено или отсутствует		≤ 32	РНК патогенных лептоспир обнаружена
отсутствует или > 25	отсутствует или > 27	отсутствует или > 32	Невалидный*
≤ 25	≤ 27	> 32	Сомнительный**

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

** В случае получения сомнительного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена РНК патогенных лептоспир.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и экстракции РНК (см. табл. 5).

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (<i>Ct</i>) по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
ОК	Экстракция РНК	≤ 25	отсутствует
ПК	Экстракция РНК	≤ 25	≤ 26
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	–	≤ 25

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ОТ-ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналу JOE/Yellow отсутствует или превышает граничное значение, указанное в таблице 5. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК патогенных видов лептоспир.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу JOE/Yellow и/или для отрицательного контроля ОТ-ПЦР (К–) на любом из каналов определено значение *Ct*. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами 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 РНК, начиная с этапа экстракции РНК.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ И АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» И АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРОВ iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США)

А. Проведение ОТ-ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала

Включить прибор и блок питания оптической части прибора. Проводить измерения не менее, чем через 30 мин после включения оптической части прибора.

Открыть программу iCycler.

Задать схему планшета - расположение пробирок в модуле и измерение флуоресцентного сигнала:

- Для прибора iCycler iQ5 в окне **Selected Plate Setup** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Редактировать схему планшета в режиме **Whole Plate loading**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE**. Задать объем реакции (**Sample Volume**): 25 мкл, тип крышек (**Seal Type**): **Domed Cap**, тип пробирок (**Vessel Type**): **Tubes**. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку **Save&Exit Plate Editing**.
- Для прибора iCycler iQ в окне **Edit Plate Setup** модуля **Workshop**, в опции **Samples: Whole Plate Loading** задать схему расположения образцов в реакционном модуле и указать имя каждой пробы в окне **Sample Identifier**. В опции **Select and load Fluorophores** задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам **FAM, JOE**. Сохранить схему планшета, задав имя файла в окне **Plate Setup Filename** (с расширением .pts) и нажав кнопку **Save this plate setup** (в верхней части экрана). Можно редактировать уже использованную ранее схему планшета; для этого в окне **Library** открыть **View Plate Setup**, выбрать нужный **Plate Setup** (файл с расширением .pts) и нажать кнопку **Edit** (справа). Отредактированный файл нужно также сохранить перед использованием. Назначить использование данной схемы планшета, нажав

кнопку **Run with selected protocol**.
Задать программу амплификации.

Таблица 6

Программа амплификации *Leptospira*

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	20 с	–	10
	65	50 с		
4	95	20 с	–	40
	61	50 с	FAM, JOE	
	65	20 с	–	

- Для прибора **iCycler iQ5** в окне **Selected Protocol** модуля **Workshop** нажать кнопку **Create New** или **Edit**. Задать параметры амплификации и сохранить протокол, нажав кнопку **Save&Exit Protocol Editing**. При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в блоке **Protocol** (по умолчанию файлы протоколов сохраняются в папке **Users**).
- Для прибора **iCycler iQ** выбрать опцию **Edit Protocol** модуля **Workshop**. Задать параметры амплификации (количество циклов, время и температуру циклирования), а в окне справа указать шаг считывания флуоресцентного сигнала: **Cycle 3 – Step 2**. Сохранить протокол, задав имя файла в окне **Protocol Filename** (**Leptospira.tmo**) и нажав кнопку **Save this protocol** (в верхней части экрана). При последующих постановках можно выбрать файл с этой программой в закладке **View Protocol** в модуле **Library**. Выбрав или отредактировав нужную программу, назначить ее использование, нажав кнопку **Run with selected plate setup**.

Поместить предварительно подготовленные для проведения ПЦР пробирки в модуль в соответствии с заданной схемой.

Запустить выполнение выбранной программы **Leptospira** с заданной схемой планшета.

- Для прибора **iCycler iQ5** перед запуском выполнения программы следует проверить правильность выбранного протокола (**Selected Protocol**) и схемы планшета (**Selected Plate Setup**). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Collect Well Factors from Experimental Plate**. Нажать кнопку **Begin Run**, дать название

эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

- Для прибора **iCycler iQ** перед запуском выполнения программы в окне **Run Prep** следует проверить правильность выбранного имени протокола и схемы планшета. Выбрать для измерения факторов лунок вариант **Experimental Plate** в меню **Select well factor source**. Задать объем реакционной смеси в окне **Sample Volume** – 25 мкл. Для запуска нажать кнопку **Begin Run**, дать название эксперимента (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента) и нажать **OK**.

После окончания программы приступить к анализу результатов.

Б. Анализ результатов

Анализ результатов по каналу JOE:

- Запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:
 - Для прибора **iCycler iQ5** выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
 - Для прибора **iCycler iQ** в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**.
 - Выбрать **Base line** в **Crossing Threshold User Defined** в диапазоне 20 – 25. В норме пороговая линия должна пересекать только сигмообразные кривые накопления сигнала положительных образцов и контролей и не пересекать кривые другой формы. В случае если это не так, необходимо повысить уровень порога.
 - Вывести на экран таблицу результатов со значениями **Ct**, нажав кнопку **PCR Quant** (**iCycler iQ**) или кнопку **Results** (**iCycler iQ5**).

Анализ результатов по каналу FAM:

- Запустить программу и открыть файл с результатами эксперимента. Для этого:

- Для прибора iCycler iQ5 выбрать нужный файл с данными анализа в окне **Data File** модуля **Workshop** и нажать кнопку **Analyze**.
- Для прибора iCycler iQ в модуле **Library** активировать окно **View Post-Run Data**. В окне **Data Files** выбрать нужный файл с данными анализа и нажать кнопку **Analyze Data**.
- Выбрать **Base line** в **Crossing Threshold User Defined** 25,0.
- Вывести на экран таблицу результатов со значениями **Ct**, нажав кнопку **PCR Quant** (iCycler iQ) или кнопку **Results** (iCycler iQ5).

В. Интерпретация результатов

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) значения порогового цикла (**Ct**) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 7

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла (Ct) по каналу			Результат
FAM		JOE	
Осадки крови и бактериальных культур	Гомогенаты тканей и осадки мочи		
≤ 27	≤ 29	отсутствует	РНК патогенных лептоспир НЕ обнаружена
определено или отсутствует		≤ 32	РНК патогенных лептоспир обнаружена
отсутствует или > 27	отсутствует или > 29	отсутствует или > 32	Невалидный*
≤ 27	≤ 29	> 32	Сомнительный**

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

** В случае получения сомнительного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата считать, что в образце обнаружена РНК патогенных лептоспир.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и экстракции РНК (см. табл. 8).

Таблица 8

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла (Ct) по каналу	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция РНК	≤ 25	отсутствует
ПК	Экстракция РНК	≤ 25	≤ 27
К–	ОТ-ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ОТ-ПЦР	-	≤ 26

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (Ct) по каналу JOE отсутствует или превышает граничное значение, указанное в таблице 8. Необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена РНК патогенных видов лептоспир.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу JOE и/или для отрицательного контроля ПЦР (К–) на любом из каналов определено значение Ct. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами 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 РНК, начиная с этапа экстракции РНК.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель

Приказом Росздравнадзора
от 30.07.11 № 3175/11/13

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

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Pneumocystis jirovecii (carinii)*
в клиническом материале методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Pneumocystis jirovecii (carinii)*-FL»

АмплиСенс®



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	9
ФОРМАТ FRT	12
СОСТАВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	13
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	14
А. Подготовка пробирок для амплификации	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	15
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	16
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	20
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей	21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец
K-	- отрицательный контроль ПЦР
K+	- положительный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*)-FL» предназначен для выявления ДНК *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) путем амплификации специфического фрагмента ДНК данного микроорганизма методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из образцов бронхоальвеолярного лаважа, мокроты, аспиратов из ротоглотки и трахеи, биоптатов легких, смывов и мазков из ротоглотки.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. При экстракции ДНК из клинического материала, содержащего клетки, происходит амплификация участка ДНК генома человека (эндогенный внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать

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

этапы ПЦР-анализа (экстракция ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность забора материала и его хранения. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента полимеразы (TaqF). В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F;

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из клинического материала и амплификацию ДНК *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения амплификации ДНК *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

ВНИМАНИЕ! Использование формы комплектации 3 производится только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для выделения ДНК	Аналитическая чувствительность
Бронхоальвеолярный лаваж, мокрота, аспираты из ротоглотки и трахеи, биоптаты легких, смывы и мазки из ротоглотки	«РИБО-преп»	500 копий/мл

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*). Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результатов методом секвенирования фрагментов амплификации.

Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении ДНК других грибов (*Penicillium auzontiae*, *P.brevicompactum*; *Ulocladium boffeyi*; *Mucor racemosus*, *M.plumbeus*; *Aspergillus versicolor*, *A.niger*, *A.flavus*, *A.fumigatus*; *Cryptococcus neoformans*), вирусов (вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса I и II типа, вирус герпеса человека 6 типа, вирус герпеса человека 8 типа, вирус Варицелла-Зостер, *Parvovirus B19* и др.), бактериальных возбудителей (*Streptococcus pyogenes*, *S.agalactiae*; *Staphylococcus aureus* и др.) и ДНК человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как

инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

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

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

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Проведение предварительной подготовки материала:

1. «МУКОЛИЗИН» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) – реагент для предобработки мокроты и бронхоальвеолярного лаважа.
2. Физиологический раствор или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2) – используется в процессе предобработки мокроты и биоптатов.
3. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, США).
4. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (TCM)» (ТУ 9398-098-01897593-2009) – для взятия биопсийного и аутопсийного материала.
5. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ТУ 9398-083-01897593-2009).
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки типа «Эппендорф» на 2,0 мл (например, Axugen, США).

Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):

7. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формой комплектации 2.
8. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.

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

9. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
10. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
11. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
12. Одноразовые наконечники с фильтром до 10 мкл, 100 мкл и 200 мкл в штативах.
13. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в

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

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Материалом для исследования служат: бронхоальвеолярный лаваж, мокрота, аспираты из ротоглотки и трахеи, биоптаты легких, смывы и мазки из ротоглотки.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК

- **бронхоальвеолярный лаваж, аспираты из ротоглотки и трахеи**

Взятие бронхоальвеолярного лаважа, аспиратов из ротоглотки и трахеи производится в стерильную пробирку типа «Эппендорф» либо стерильные одноразовые контейнеры.

Для проведения исследования необходимо провести предобработку анализируемого материала. Образец тщательно ресуспендировать. Автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отобрать 1 мл материала и перенести в новую стерильную пробирку типа «Эппендорф» для проведения центрифугирования при 7000 g (8-10 тыс об/мин в центрифуге на 24 места или 10-13 тыс об/мин в центрифуге на 12 мест) в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отобрать, используя наконечник с фильтром и оставляя над осадком 200 мкл жидкости, затем ресуспендировать материал на вортексе.

Допускается хранение бронхоальвеолярного лаважа, аспиратов из ротоглотки и трахеи и предобработанного материала в течение суток при температуре от 2 до 8 °С, в течение 7 сут при температуре не выше минус 16 °С, длительное хранение – при температуре не выше минус 68 °С.

ВНИМАНИЕ! Многократное замораживание-оттаивание материала недопустимо!

– **мокрота**

Мокроту собирают в стерильные одноразовые контейнеры, после предварительного полоскания полости рта кипяченой водой.

Для проведения исследования необходимо провести предобработку анализируемого материала. В емкость с мокротой добавить реагент «МУКОЛИЗИН» (не входит в состав набора реагентов) в соотношении 5:1 (5 частей «МУКОЛИЗИНА» к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке емкости. В процессе разжижения мокроты (20-30 мин) емкость необходимо периодически встряхивать. Затем автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отобрать 1 мл материала, поместить в завинчивающуюся пробирку емкостью 1,5 мл или пробирку «с защелкой», промаркировать ее и центрифугировать при 7000 g (8-10 тыс об/мин в центрифуге на 24 места или 10-13 тыс об/мин в центрифуге на 12 мест) в течение 10 мин. С помощью вакуумного отсоса удалить надосадочную жидкость, осадок ресуспендировать в 100 мкл PBS-буфера (или

физиологического раствора) и использовать для экстракции ДНК.

Допускается хранение вышеперечисленного материала до проведения исследования в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 7 сут при температуре не выше минус 16 °С, длительное хранение – при температуре не выше минус 68 °С.

ВНИМАНИЕ! Многократное замораживание-оттаивание материала недопустимо!

– **биопсийный и аутопсийный материал**

Взятие материала осуществляют из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с повреждением участка.

Кусочки ткани диаметром не более 5 мм помещают в одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2 мл, содержащие 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Допускается хранение образцов при комнатной температуре в течение 6 ч, при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 сут, длительное хранение – при температуре не выше минус 16 °С.

Для проведения исследования из тканей большего объема необходимо поместить небольшой кусочек образца в стерильную фарфоровую ступку, добавить равный объем PBS-буфера. Тщательно растереть фарфоровым пестиком для получения однородной суспензии клеток. Отобрать аликвоту 100 мкл в стерильную пробирку для экстракции ДНК. Допускается хранение суспензии при температуре не выше минус 16 °С.

- **смывы и мазки из ротоглотки** берут стерильным зондом и помещают в «Транспортную среду для хранения и транспортировки респираторных мазков» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Допускается хранение образцов при температуре от 2 до 8 °С не более суток и при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

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

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT <i>P.jirovecii</i> / Glob	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК <i>P.jirovecii</i> и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*)-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести 100 мкл ОК.

При работе с формой выпуска набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

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

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

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

2. Подготовить реакционную смесь. Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку двух контрольных точек этапа амплификации ПЦР: положительный и отрицательный контроль ПЦР. Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования реагентов.
3. В отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь-1-FRT *P.jirovecii* / Glob и заранее подготовленную смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Расчет производится исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *P.jirovecii* / Glob;
 - 5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).
4. Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно расчетной таблице, приведенной в Приложении.
 5. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора. Раскапать в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
 6. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл исследуемой ДНК, выделенной из клинических или контрольных образцов.
 7. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К–) – вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера;
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *P.jirovecii* и ДНК человека.
- Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»**
1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1» (см. табл. 1).

Программа «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа ³			Приборы планшетного типа ⁴		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации участка **ДНК β -глобинового гена (BKO Glob)**;
- по каналу для флуорофора **JOE** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации участка **ДНК *Pneumocystis jirovecii* (carinii)**.

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

⁴ Например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США); Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа невалидный, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t по каналу для флуорофора JOE и по каналу для флуорофора FAM значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает значение, указанное во вкладыше. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.
- Для клинических образцов, в которых значения C_t по каналу JOE превышают порог, указанный во вкладыше, результат считается сомнительным. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторях. В случае получения воспроизводимого положительного значения C_t результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторях значений результат считать сомнительным.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также «Методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления

ДНК *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*)-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

ВНИМАНИЕ!

1. Появление любого значения *Ct* по каналам FAM и JOE в таблице результатов для отрицательного контроля этапа ПЦР (K-) и для отрицательного контроля этапа экстракции (OK) – свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае следует повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК начиная с этапа экстракции ДНК.
2. Если для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить анализ всех образцов начиная с этапа ПЦР.
3. Если значения *Ct* по каналу FAM в таблице результатов для исследуемых образцов отсутствуют, это означает сбой этапа экстракции. Необходимо повторить анализ для этих образцов начиная с этапа экстракции.
4. Если для анализируемого образца значение *Ct* по каналам FAM и JOE превышает указанное во вкладыше, то

ФОРМАТ FRT

необходимо провести повторный анализ данного образца начиная с этапа экстракции. Высокие значения C_t могут быть вызваны потерями ДНК при экстракции или наличием ингибиторов.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-преп» и «ПЦР-комплект» (кроме ПЦР-смеси-1-FRT *P.jirovecii* / Glob, ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *P.jirovecii* / Glob, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *P.jirovecii* / Glob хранить в защищенном от света месте.

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

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГОУ ДПО "РМАПО Росздрава",
д.м.н., профессор

В.В. Долгов

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей

Количество исследуемых клинических образцов с учетом контролей	ПЦР-смесь-1-FRT <i>P.jirovecii</i> / Glob (мкл)	ПЦР-смесь-2-FRT + полимераза (TaqF) (мкл)
1	40	20
2	50	25
3	60	30
4	70	35
5	80	40
6	90	45
7	100	50
8	110	55
9	120	60
10	130	65
11	140	70
12	150	75
13	160	80
14	170	85
15	180	90
16	190	95
17	200	100
18	210	105
19	220	110
20	230	115
21	240	120
22	250	125
23	260	130
24	270	135
25	280	140
26	290	145
27	300	150
28	310	155
29	320	160
30	330	165
31	340	170
32	350	175
33	360	180
34	370	185

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
	Код партии		Максимальное число тестов
	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 22.07.2011 № 4481-Пр/11

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

В.И.Покровский
«22» июль 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (ОРВИ): РНК респираторно-синцитиального вируса (*human Respiratory Syncytial virus – hRSv*), метапневмовируса (*human Metapneumovirus – hMpv*), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (*human Parainfluenza virus-1-4 – hPiv*), коронавирусов (*human Coronavirus – hCov*), риновирусов (*human Rhinovirus – hRv*), ДНК аденовирусов групп В, С и Е (*human Adenovirus B, C, E – hAdv*) и бокавируса (*human Bocavirus – hBov*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL»

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	4
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК/РНК.....	11
ВАРИАНТ FRT.....	13
СОСТАВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК.....	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	15
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации.....	16
А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.....	16
А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.....	17
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».....	18
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	22
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	23
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....	30
ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....	32

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ОРВИ	- Острые респираторные вирусные инфекции
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
РНК	- Рибонуклеиновая кислота
ДНК	- Дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- Комплементарная ДНК получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
ПКО	- Положительный контрольный образец
ВКО STI-rec	- Внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ОК	- Отрицательный контроль экстракции ДНК/РНК
К-	- Отрицательный контроль ПЦР
К+	- Положительный контроль ПЦР
ВК+	- Положительный контроль амплификации образца ВКО STI-rec
ФГУН ЦНИИЗ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» предназначен для выявления и идентификации специфических фрагментов нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (ОРВИ): РНК респираторно-синцитиального вируса (*human Respiratory Syncytial virus – hRSv*), метапневмовируса (*human Metapneumovirus – hMpv*), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (*human Parainfluenza virus-1-4 – hPiv*), коронавирусов видов OC43, E229, NL63, HKUI (*human Coronavirus – hCov*), риновирусов (*human Rhinovirus – hRv*), ДНК аденовирусов групп В, С и Е (*human Adenovirus – hAdv*) и бокавируса (*human Bocavirus – hBov*) в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы кДНК, полученные из следующего клинического материала: мазков из полости носа и ротоглотки, мокроты (либо аспиратов из трахеи), бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), промывных вод бронхов, секционного материала. Для экстракции ДНК/РНК и

Вариант FRT Форма 1: REF R-V57, REF H-1551-1-2;
 Форма 2: REF R-V57-100-F(RG,IQ,Dt), REF H-1552-1 / VER 10.05.11 / стр. 3 из 32

получения кДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Полный анализ включает следующие этапы: экстракция (выделение) ДНК/РНК из образцов клинического материала, обратная транскрипция РНК, ПЦР-амплификация участков геномов микроорганизмов и гибридационно-флуоресцентная детекция флуоресцентного сигнала, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК/РНК микроорганизмов из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-rec), использование которого позволяет контролировать качество выполнения процедур исследования для каждого образца.

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 варианте.

Вариант FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

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

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

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для выделения ДНК/РНК и получения кДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,iQ,Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 4 из 32

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

(при исследовании мазков из полости носа и ротоглотки)

Возбудитель	Комплект для выделения ДНК/РНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ¹
Респираторно-синцитиальный вирус	РИБО-сорб, РИБО-преп, «NucliSENS easyMAG»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ³
Метапневмовирус человека	РИБО-сорб, РИБО-преп, «NucliSENS easyMAG»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ³
Вирусы парагриппа тип 1-4	РИБО-сорб, РИБО-преп, «NucliSENS easyMAG»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ³
Коронавирусы человека	РИБО-сорб, РИБО-преп, «NucliSENS easyMAG»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ⁴
Бокавирус человека	РИБО-сорб, РИБО-преп, «NucliSENS easyMAG»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ³
Аденовирусы	РИБО-сорб, РИБО-преп, «NucliSENS easyMAG»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	5x10 ³
Риновирусы	РИБО-сорб, РИБО-преп, «NucliSENS easyMAG»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ³

Аналитическая специфичность

Набор реагентов позволяет обнаружить фрагменты кДНК/ДНК заявленных возбудителей ОРВИ. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании следующих референсных штаммов: респираторно-синцитиальный вирус человека «Лонг» тип А, риновирусы человека (типы 13, 15, 16, 17, 21, 26 и 29), а также при исследовании клинического материала с последующим подтверждением методом секвенирования фрагментов амплификации: респираторно-синцитиальных вирусов типы А и

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

Вариант FRT Форма 1: REF R-V57, REF H-1551-1-2;

Форма 2: REF R-V57-100-F(RG,I,Q,D), REF H-1552-1 / VER 10.05.11 / стр. 5 из 32

В, вирусов парагриппа (типы 1-4), коронавирусов человека OC43, E229, NL63, HKU1, аденовирусов человека групп В, С и Е; метапневмовирусов человека (типы А и В), бокавируса человека. В реакции на наличие РНК риновирусов возможно выявление близкородственных вариантов энтеровирусов. Реакция по обнаружению аденовирусов не предназначена для типирования (возможно взаимодействие с близкородственными вариантами других типов аденовирусов).

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении кДНК/ДНК других вирусных (вирусы гриппа А и В, коронавирус вызывающий ТОРС (Frankfurt), коронавирусы вызывающие инфекционный перитонит кошек (F1, F2, F5) и гастроэнтерит свиней (TGC1, TGC8, TGC 9), вирусы герпеса, цитомегаловирус, энтеровирусы (типы Echo9, Echo30) и 60 образцов спинномозговой жидкости больных менингитом, содержащих РНК энтеровирусов) и бактериальных возбудителей ОРЗ (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*), нормальной микрофлоры полости носа и ротоглотки человека и кДНК/ДНК человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с

Вариант FRT Форма 1: REF R-V57, REF H-1551-1-2;

Форма 2: REF R-V57-100-F(RG,IQ,Dt), REF H-1552-1 / VER 10.05.11 / стр. 6 из 32

микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы 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.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Сбор материала для анализа:

1. Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков (ТУ 9398-083-01897593-2009) – реагент для хранения мазков из полости носа и ротоглотки.

Проведение предварительной подготовки материала:

2. МУКОЛИЗИН (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) – реагент для проведения предварительной подготовки мокроты и аспиратов вязкой консистенции.
3. Стерильный физиологический раствор или фосфатный буферный раствор – для предварительной подготовки

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,IQ,D), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 7 из 32

секционного материала.

ЗОНА 1. Экстракция ДНК/РНК из клинического материала:

4. Комплект реагентов для выделения – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЗ Роспотребнадзора.
5. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК/РНК.
6. Автоматическая станция для выделения ДНК/РНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.
7. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнитная силика) (bioMérieux, Франция)) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции

8. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции –«РЕВЕРТА-L» с реагентом RT-G-mix-1 (ТУ 9398-005-01897593-2008) – вариант 100 или вариант 50.

ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции, ПЦР и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

9. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР «Ламинар-С»», «Ламинарные системы», Россия).
10. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
11. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
12. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл и от 200 до 1000 мкл).
13. Одноразовые наконечники с фильтром до 200 мкл и 1000 мкл в штативах.
14. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл и 0,1 мл.

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,IQ,D), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 8 из 32

15. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
16. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
17. Емкость для сброса наконечников.
18. Программируемый амплификатор роторного типа (например, Rotor-Gene 3000 или 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) или амплификатор планшетного типа (например, iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) или эквивалентные).
19. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-100 F:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Ахуген, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат:

- мазки из полости носа и ротоглотки;
- мокрота (либо аспираты из носоглотки и трахеи);
- бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) (либо промывные воды бронхов);
- секционный материал (фрагменты пораженной части легких).

Сбор мазков из полости носа

Мазки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Зонд с ватным тампоном вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

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

Сбор мазков из ротоглотки

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

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

ВНИМАНИЕ! При сборе мазков рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 500 мкл транспортной среды

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,IQ,Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 10 из 32

для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Мокрота или аспират из носоглотки или трахеи

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

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) и промывные воды бронхов

Получают традиционным способом и помещают в стерильные одноразовые контейнеры.

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

Секционный материал

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК/РНК

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

Мазки из респираторного тракта. Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.

Мокрота или аспират из носоглотки или трахеи. Работа выполняется по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл) используют для экстракции ДНК/РНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) и промывные воды бронхов.

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,iQ,Di), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 11 из 32

Для выделения используют 100 мкл материала. При необходимости повторного проведения анализа остаток материала замораживают.

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

ВАРИАНТ FRT

ВАРИАНТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации кДНК и идентификации возбудителей ОРВИ с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL hRSv – hMpv раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FL hPiv 1/3 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FL hPiv 2/4 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FL hCov раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FL hAdv – hBov раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-1-FL hRv раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	4 пробирки
ПКО кДНК hRSv – hMpv	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК hPiv 1/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК hPiv 2/4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК hRv	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО кДНК hCov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК hAdv – hBov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	3 пробирки
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации для каждой ПЦР-смеси-1-FL, включая контроли.

ВАРИАНТ FRT

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации кДНК и идентификации возбудителей ОРВИ с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL-F hRSv – hMpv	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-1-FL-F hPiv 1/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-1-FL-F hPiv 2/4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-1-FL-F hCov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-1-FL-F hAdv – hBov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-1-FL-F hRv	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	6 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	6 пробирок
ПКО кДНК hRSv – hMpv	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК hPiv 1/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК hPiv 2/4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК hCov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК hRv	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО ДНК hAdv – hBov	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	6 пробирок
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций амплификации для каждой ПЦР-смеси-1-FL-F, включая контроли.

ВАРИАНТ FRT

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО STI-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	10 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования, в зависимости от типа используемого оборудования, изложена в методических рекомендациях ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (ОРВИ) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL»».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ РНК

Для экстракции ДНК/РНК и проведения реакции обратной транскрипции используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Экстракция ДНК/РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-rec). Процедура использования рекомендованных наборов реагентов детально описана в Приложениях 1 и 2.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! На этапе амплификации при каждой постановке реакции используются положительные контроли амплификации возбудителей (см. табл. 1), положительный контроль амплификации внутреннего контрольного образца ВК+ (ПКО

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,IQ,Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 15 из 32

ВАРИАНТ FRT

STI-88) и отрицательный контроль ПЦР (К-), предназначенный для контроля чистоты реагентов и аккуратности работы оператора. Кроме того, на этапе амплификации исследуется отрицательный контроль этапа экстракции ДНК/РНК (ОК).

Таблица 1

Соответствие наименования ПЦР-смеси-1-FL и положительных контрольных образцов амплификации возбудителей ОРВИ

Наименование ПЦР-смеси-1-FL	Наименование положительных контрольных образцов
<i>hRSv – hMpv</i>	ПКО кДНК <i>hRSv – hMpv</i>
<i>hAdv – hBov</i>	ПКО ДНК <i>hAdv – hBov</i>
<i>hRv</i>	ПКО кДНК <i>hRv</i>
<i>hPiv 1/3</i>	ПКО кДНК <i>hPiv 1/3</i>
<i>hPiv 2/4</i>	ПКО кДНК <i>hPiv 2/4</i>
<i>hCov</i>	ПКО кДНК <i>hCov</i>

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации
Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

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

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

А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FL соответствующего наименования (см. табл. 1) для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. На поверхность воска внести по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FL.
3. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
4. Поставить контрольные реакции (для каждого наименования

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,IQ,Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 16 из 32

ВАРИАНТ FRT

ПЦР-смеси-1-FL, см. табл. 1):

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО (см. табл. 1).
 - в) положительный контроль ПЦР ВКО STI-rec (ВК+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО STI-88.
 - г) отрицательный контроль экстракции (ОК) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из ОКО.
5. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки кратким центрифугированием на вортексе (1-2 с) (для приборов планшетного типа).

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

1. Разморозить необходимое количество пробирок с ПЦР-смесь-1-FL-F соответствующего наименования (см. табл. 1). Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-1-FL-F, ПЦР-смесью-2-FRT и полимеразой (TaqF) и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке 10·(N+1) мкл ПЦР-смеси-1-FL-F соответствующего наименования (см. табл. 1), 5·(N+1) мкл ПЦР-смеси-2-FRT, и 0,5·(N+1) мкл полимеразы (TaqF). (Расчетная таблица приготовления реакционных смесей в Приложении 3).
4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по 15 мкл подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
7. Поставить контрольные реакции (для каждого наименования ПЦР-смесь-1-FL-F, см. табл. 1):
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,iQ,Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 17 из 32

ВАРИАНТ FRT

- 10 мкл ПКО (см. табл. 1).
- в) положительный контроль ПЦР ВКО STI-rec (BK+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО STI-88.
- г) отрицательный контроль экстракции (OK) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из OKO.
8. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки, кратким центрифугированием на вортексе (1-2 с) (для приборов планшетного типа).

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 2).

Таблица 2

Программа амплификации ОРВИ-Скрин

Цикл	Приборы роторного типа ²			Приборы планшетного типа ³		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-100 F)	1	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-100 F)	1
2	95	10 с	10	95	10 с	10
	54	20 с		54	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	35	95	10 с	35
	54	20 с детекция флуоресц. Сигнала		54	25 с детекция флуоресц. Сигнала	
	72	10 с		72	25 с	

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM/Green, JOE/Yellow/HEX и ROX/Orange.

ВНИМАНИЕ! Не допускается одновременная постановка теста «*Rhinovirus*» с другими тестами набора «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» на приборах iQ iCycler, iQ5 (Bio-Rad, США).

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля

² например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q или аналогичные

³ например, ДТ-96, iQ5, iCycler iQ или аналогичные

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,IQ,D), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 18 из 32

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

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК/ДНК значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе (см. табл. 3).

ВНИМАНИЕ! Анализ данных для каждой ПЦР-смеси-1 следует проводить индивидуально, выделив область пробирок, относящихся к данной ПЦР-смеси-1. Для анализа результатов теста «*Rhinovirus*» (*hRv*) необходимо использовать только каналы **FAM** и **ROX**.

Таблица 3

**Соответствие наименования ПЦР-смеси-1-FL
и каналов детекции возбудителей ОРВИ**

Наименование ПЦР-смеси-1-FL	Детекция по каналу		
	FAM/Green	JOE/Yellow/HEX	ROX/Orange
<i>hRSv – hMpv</i>	BKO STI-rec	<i>hRSv</i>	<i>hMpv</i>
<i>hAdv – hBov</i>	BKO STI-rec	<i>hBov</i>	<i>hAdv</i>
<i>hRv</i>	BKO STI-rec	–	<i>hRv</i>
<i>hPiv 1/3</i>	BKO STI-rec	<i>hPiv 3</i>	<i>hPiv 1</i>
<i>hPiv 2/4</i>	BKO STI-rec	<i>hPiv 2</i>	<i>hPiv 4</i>
<i>hCov</i>	BKO STI-rec	NL-63, 229E	HKU-1, OC 43

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК/РНК возбудителя ОРВИ обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую

- линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК/РНК возбудителя ОРВИ не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное (граничное) значение.
 - Результат анализа считается невалидным, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t по соответствующему каналу детекции возбудителей ОРВИ (см. табл. 3), и по каналу FAM/Green значение C_t также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК/РНК.

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения C_t указаны в методических рекомендациях ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Методические рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» и вкладыше к набору реагентов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК/РНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 4).

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
		FAM/Green	JOE/Yellow/HEX	ROX/Orange
		Детекция ВКО STI-rec	Детекция возбудителя ОРВИ	Детекция возбудителя ОРВИ
ОК	Экстракция РНК/ДНК	<u>Меньше порогового значения</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
К-	ПЦР	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
ВК+	ПЦР	<u>Меньше порогового значения</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
К+	ПЦР	<u>Отсутствует</u>	<u>Меньше порогового значения*</u>	<u>Меньше порогового значения</u>

* ПКО кДНК *hRv* не определяется по каналу JOE

ВНИМАНИЕ!

1. Если для К+ значение порогового цикла по каналу(ам) JOE/Yellow/HEX и/или ROX/Orange отсутствует или превышает граничное значение порогового цикла, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.
2. Если для ОК и/или К- значение порогового цикла по каналу детекции возбудителя меньше граничного значения, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК/РНК возбудителя, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. Вариант FRT – 9 мес. Вариант FRT-100 F – 12 мес. Набор реагентов

с истекшим сроком годности применению не подлежит.

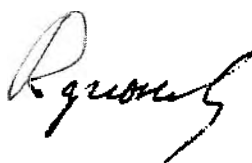
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить при температуре от 2 до 8 °С. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F разукomплектовать: ПЦР-смесь-2-FRT, ПЦР-смесь-1-FL-F (объемом 0,2 мл), полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С; остальные реагенты хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смеси-1-FL и ПЦР-смеси-1-FL-F хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).⁴

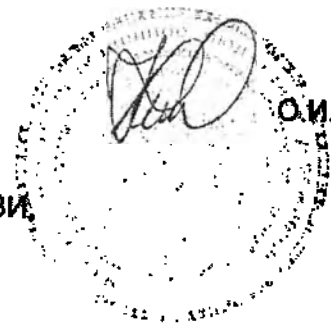
Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н.Родионова

Директор ФГБУ «НИИ гриппа»
Минздравсоцразвития России

Руководитель Федерального Центра по гриппу и ОРВИ
Академик РАН, д.б.н.



О.И.Киселев

⁴ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК ИЗ ПРОБ

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для проведения экстракция ДНК/РНК из образцов)

А. При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб»

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

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,IQ,DI), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 23 из 32

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК

- используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
 9. Повторить отмывку раствором для отмывки 3, следуя п. 8.
 10. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
 11. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °C на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
 12. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя наконечники с фильтром, свободные от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 60 °C на 2-3 мин. Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 1 мин.
- Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК и ДНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции. Отбирать раствор для реакции нужно очень осторожно, не захватывая сорбент. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.
- Очищенная РНК может храниться до 4 ч при температуре от 2 до 8 °C. Для длительного хранения препарата необходимо отобрать раствор РНК, не захватывая сорбент, перенести в стерильную пробирку и хранить в течение года при температуре не выше минус 68 °C.
- Б. При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»**
1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от 2 до 8 °C) прогреть при температуре 65 °C до полного растворения кристаллов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК

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

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,IQ,Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 25 из 32

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК

14. Поместить пробирки в термостат с температурой 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по 50 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге.
17. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции.
Очищенные РНК можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение месяца – при температуре не выше минус 16 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

В. При использовании автоматической станции «NucliSENS easyMAG»

Вариант 1. Экстракция РНК с лизисом образца вне прибора
Данный метод экстракции позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки (мокрота, аспираты).

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК/РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для экстракции ДНК/РНК (установить *Other*), объем образца (*Volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Euate*) – 25 mkl, тип образца (*Type*) – *Lysed*, очередность экстракции РНК в образцах (*priority*) – *normal*.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК/РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: *On-board Lysis Buffer Dispensing – no*, *On-board Lysis Incubation – no*.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции ДНК/РНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,iQ,Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 26 из 32

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК

отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по 10 мкл ВКО STI-рес. Добавить в пробирки по 550 мкл буфера для лизиса NucliSens.

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

6. В пробирки с раствором для лизиса и ВКО STI-рес, внести по 100 мкл подготовленных проб, используя наконечники с фильтром и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.)
7. В пробирку ОК внести 100 мкл ОКО.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Ресуспендировать пробирку с магнитной силикой NucliSens, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром по 25 мкл магнитной силики и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК/РНК с лизисом образцов вне прибора (*Off board*).
11. После окончания экстракции ДНК/РНК, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции. При необходимости хранения очищенные РНК следует перенести в стерильные пробирки не позднее 30 мин после экстракции. Очищенные РНК можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение месяца – при температуре не выше минус 16 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG,IQ,Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 27 из 32

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК

Вариант 2. Экстракция РНК с лизисом образца в приборе

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для экстракции ДНК/РНК (установить *Other*), объем образца (*Volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Eluate*) – 25 mkl, тип образца (*Type*) – *Primary*, очередность экстракции РНК в образцах (*Priority*) – *normal*.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК/РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: *On-board Lysis Buffer Dispensing* – *Yes*, *On-board Lysis Incubation* – *Yes*.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции ДНК/РНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая ОК). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по 10 мкл ВКО STI-rec.
6. В пробирки с ВКО внести по 100 мкл подготовленных проб, используя наконечники с фильтром. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку ОК внести 100 мкл ОКО.
8. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции РНК с лизисом образцов в приборе (*on board*).
9. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении *Instrument State* – *Idle*.
10. Ресуспендировать пробирку с магнитной силикой NucliSens, интенсивно перемешав на вортексе. Открыть крышку прибора, в каждую пробирку внести отдельным наконечником с фильтром по 25 мкл магнитной силики и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
11. Закрыть крышку прибора и продолжить программу экстракции РНК.

Вариант FRT Форма 1: **REF** R-V57, **REF** H-1551-1-2;

Форма 2: **REF** R-V57-100-F(RG, IQ, Dt), **REF** H-1552-1 / **VER** 10.05.11 / стр. 28 из 32

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК/РНК

12. После окончания экстракции ДНК/РНК, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Рекомендуется проводить реакцию обратной транскрипции сразу по окончании экстракции.

При необходимости хранения очищенные РНК следует перенести в стерильные пробирки не позднее 30 мин после экстракции. Очищенные РНК можно хранить до 4 ч при температуре от 2 до 8 °С, в течение месяца – при температуре не выше минус 16 °С, более длительно – при температуре не выше минус 68 °С.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ
(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения амплификации)

ВНИМАНИЕ! Объемы реакционной смеси и РНК отличаются от описанных в стандартной инструкции комплекта реагентов для проведения реакции обратной транскрипции – «РЕВЕРТА-L» с реагентом RT-G-mix-1 (ТУ 9398-005-01897593-2008) – вариант 100 или вариант 50. Для проведения 50 реакций обратной транскрипции требуется 2 комплекта «РЕВЕРТА-L» вариант 50 или 1 комплект «РЕВЕРТА-L» вариант 100. Для проведения 100 реакций обратной транскрипции требуется 2 комплекта «РЕВЕРТА-L» вариант 100.

Общий объем реакции – 40 мкл, объем РНК-пробы – 20 мкл.
ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 (0,5) мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 6 реакций. Для этого в пробирку с RT-mix внести 5 мкл RT-G-mix-1 и тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
3. К полученному раствору добавить 6 мкл ревертазы (MMiv), пипетировать 5 раз, перемешать на вортексе. Осадить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.
4. Внести в пробирки по 20 мкл готовой реакционной смеси.
5. Используя наконечник с фильтром, добавить 20 мкл РНК-пробы в пробирку с реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) при температуре 37 °С на 30 мин.
7. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером (к 40 мкл кДНК отдельным наконечником с фильтром добавить 40 мкл ДНК-буфера, перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с на вортексе для удаления капель с внутренней поверхности крышки

ОБРАТНАЯ ТРАНСКРИПЦИЯ

пробирки).

Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 нед или при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

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

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	Объем реактивов на указанное количество реакций		
	10.00	5.00	0.50
Число реакций ⁵	ПЦР-смесь-1-FL, мкл	ПЦР-смесь-2- FRT, мкл	Полимераза (TaqF), мкл
6	60	30	3.0
8	80	40	4.0
10	100	50	5.0
12	120	60	6.0
14	140	70	7.0
16	160	80	8.0
18	180	90	9.0
20	200	100	10.0
22	220	110	11.0
24	240	120	12.0
26	260	130	13.0
28	280	140	14.0
30	300	150	15.0
32	320	160	16.0

⁵ Число исследуемых образцов, включая контроль этапа экстракции ДНК (N), контроля этапа ПЦР, с запасом на один образец (N+3+1).

Вариант FRT Форма 1: REF R-V57, REF H-1551-1-2;
Форма 2: REF R-V57-100-F(RG,iQ,Dt), REF H-1552-1 / VER 10.05.11 / стр. 32 из 32



Набор реагентов
для выявления
ДНК *Bordetella bronchiseptica*
методом полимеразной
цепной реакции
в режиме реального времени

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
V-5475
РеалБест-Вем ДНК *Bordetella bronchiseptica*

Набор реагентов «РеалБест-Вет ДНК *Bordetella bronchiseptica*» предназначен для выявления ДНК бактерий *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из биологических проб (смывы с носоглотки, со слизистой трахеи и бронхов, отделяемое слизистых оболочек респираторного тракта) проводится с помощью наборов реагентов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест УниМаг».

Набор реагентов предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа «CFX96», («Bio-Rad», США), «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

Набор реагентов может быть использован для диагностики бордетеллезной инфекции у животных.

1. СОСТАВ НАБОРА:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка, 1 мл;
- отрицательный контрольный образец (ОКО) – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок;
- оптическая плёнка – 1,5 листа.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода.

ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из биологических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

3.1. При работе с набором следует соблюдать Правила проведения лабораторных исследований в области ветеринарии (Приложение к В-5475

приказу Минсельхоза России от 5 ноября 2008 года № 490).

3.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (*опасности*) и возбудителями паразитарных болезней».

3.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

3.4. ПКО и ОКО содержат натрия азид в концентрации 0,05%.

3.5. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

3.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

3.7. Для проведения анализа необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

3.8. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

3.9. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать дезинфицирующими средствами, регламентированными санитарными правилами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

3.10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «CFX96» («Bio-Rad», США); «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;
- бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, ЗАО «Ламинарные системы», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- дозаторы одноканальные с переменным объемом (например, «Biohit», Финляндия);

V-5475

- мини-шейкер (например, «PSU-2T», фирма «BioSan», Латвия или «BioShake iQ» фирма «Analytik Jena», Германия, или их аналог);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитропреновые (например, «NeoTouch», «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, «FillTip», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 мл (например, «Хеликон», Россия);
- ёмкость для сброса наконечников (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», Россия);
- нож канцелярский или ножницы.

5. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

5.1. Подготовка анализируемых образцов.

В качестве исследуемого материала используются биологические пробы: смывы с носоглотки, со слизистой трахеи и бронхов, отделяемое слизистых оболочек респираторного тракта.

Подготовить образцы для исследования с помощью наборов реагентов для выделения

ДНК «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 8», «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест УниМаг» в соответствии с инструкцией по применению.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и ОКО, которые являются компонентами данного набора.

5.2. Подготовка реагентов.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке (не вскрывая!) при комнатной температуре (18–26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отрезать канцелярским ножом или ножницами необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой. Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в полиэтиленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2–8) °С составляет 3 месяца.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. Пробирки с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

6.2. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок! Плотнo заклейить оптической плёнкой.

Для повышения эффективности и скорости смещения компонентов рекомендуется перемешать содержимое пробирок в мини-шейкере с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

6.3. Поместить пробирки в амплификатор.

6.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК возбудителя инфекции и ДНК ВКО и детекции флуоресцентных сигналов.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

6.4.1. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд,
60 °C – 20 секунд*).

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

6.4.2. Выбрать каналы детекции амплификации ДНК ВКО и ДНК возбудителя инфекции:

- «FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

- «ROX» – для регистрации сигнала ДНК возбудителя инфекции.

6.4.3. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

6.5. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресцентных сигналов в режиме реального времени.

7. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

7.1. В ПКО должно фиксироваться:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла Ct ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК возбудителя инфекции (канал «ROX») и определяться значение порогового цикла Ct ПКО.

7.2. В ОКО должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла Ct ВКО. При этом не должно фиксиро-

ваться нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 7.7).

7.3. В каждом исследуемом образце должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определяться C_t ВКО.

7.4. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим ДНК возбудителя инфекции, если для данного образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40, при этом значение C_t по каналу «FAM» может быть любым.

7.5. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

7.6. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителя инфекции), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО отличается от значения $(C_t \text{ ВКО})_{cp}$ более, чем на 2, то результат не подлежит учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

7.7. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности.

V-5475

13

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30;

тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ

Настройка экспозиции измерений при проведении анализа на приборах «ДТпрайм», «ДТлайт» (НПО «ДНК-Технология»)

В режиме «Работа с прибором» в меню «Настройки» выберите пункт «Экспозиция измерений».

В открывшемся окне выберите канал «FAM», измените значение экспозиции на «250», для каналов «HEX» и «ROX» установи-

те значение экспозиции «1000». Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав «ДА».

Внимание! Указанные значения экспозиций применимы только для наборов «РеалБест» и при необходимости должны быть изменены на исходные.

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

	Номер по каталогу		
	Содержимого достаточно для проведения п количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 334-35-90.

24.02.21

V-5475

15

**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

**Международный сертификат
ISO 13485**

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492

**Тел.: (383) 332-37-58, 332-37-10, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52**

Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru

Прошито и пронумеровано

334 листов

« _____ » 20 ____ года

Генеральный директор

Бердникова Н.В.

