УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 25.11.2011г. № 2226-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
«29» 04 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *N.meningitidis / H.influenzae / S.pneumoniae*-FL»

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ... 3
НАЗНАЧЕНИЕ ... 3
ПРИНЦИП МЕТОДА ... 3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ... 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ... 4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ... 5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ ... 6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ... 8
ВАРИАНТ FEP ... 9
СОСТАВ ... 9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ ... 9
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ... 10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ ... 10
А. Подготовка пробирок для амплификации ... 10
Б. Проведение амплификации ... 12
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» ... 13
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ... 14
ВАРИАНТ FRT ... 18
СОСТАВ ... 18
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ ... 18
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ... 19
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ... 19
А. Подготовка пробирок для амплификации ... 19
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ... 20
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ... 21
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ ... 25
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией по «конечной точке» ... 26
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» ... 27

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- детекция по «конечной точке»
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *N.meningitidis / H.influenzae / S.pneumoniae*-FL»** предназначен для выявления ДНК *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в образцах спинномозговой жидкости методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания[1].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на одновременной амплификации участков ДНК *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*, а также участка внутреннего контрольного образца (ВКО) в двух реакционных пробирках (формат «мультиплекс-ПЦР») и гибридизационно-флуоресцентной детекции, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Реакционная смесь содержит олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые гибридизационные зонды, которые комплементарны внутренним специфическим участкам амплифицируемого фрагмента. Флуоресцентный сигнал, испускаемый флуоресцентно-меченым зондом, детектируется оптическим блоком амплификатора непосредственно в процессе реакции в реальном времени (формат FRT) или флуоресцентным

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

детектором по окончании амплификации (формат FEP). Флуоресцентно-меченые зонды для каждой из мишеней имеют свою длину волны, что позволяет регистрировать сигнал по соответствующему каналу. Для детекции трех возбудителей и ВКО используется амплификатор или флуоресцентный детектор с оптическим блоком, имеющим 2 и более каналов.

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 варианте.

Вариант FEP/FRT

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

Форма 1 включает «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения одновременной амплификации участков ДНК *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» или по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции (выделения) ДНК из клинического материала, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для выделения ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Патоген	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл[2]
Спинномозговая жидкость	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	*Neisseria meningitidis*	$1x10^3$
			Haemophilus influenzae	
			Streptococcus pneumoniae	

Аналитическая специфичность

Оценку специфичности набора реагентов «АмплиСенс® *N.meningitidis / H.influenzae / S.pneumoniae*-FL» проводили при исследовании следующих штаммов микроорганизмов: *Enterobacter aerogenes; Enterobacter cloacae; Enterococcus faecalis* (ГИСК 29212); *Escherichia coli* (NCTC 9001); *Escherichia*

[2] Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

coli (ATCC 25922); *Haemophilus parainfluenzae; Haemophilus Haemolyticus; Klebsiella oxytoca; Klebsiella pneumoniae; Listeria monocytogenes; Moraxella catarrhalis; Neisseria cinereae; Neisseria elongate; Neisseria flavescens; Neisseria gonorrhoeae; Neisseria mucosa; Neisseria sicca; Neisseria subflava; Pantoea agglomerans; Proteus mirabilis; Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella enteritidis* (ГИСК 1137); *Salmonella typhi* (Central Public Health Laboratory (London) 5715); *Shigella flexneri* 2a (ГИСК 1270); *Shigella sonnei* (ГИСК 9090); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305); *Streptococcus pneumonia; Streptococcus agalactiae; Streptococcus milleri; Streptococcus mitis; Streptococcus mutans; Streptococcus pyogenes; Streptococcus salivarius; Streptococcus sanguis; Streptococcus suis; Streptococcus viridians; Yersinia enterocolitica; Yersinia pseudotuberculosis*. Также аналитическую специфичность оценивали при тестировании ДНК человека. Неспецифических реакций выявлено не было.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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 нукулеиновых 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- 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.
- 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. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009), «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

   Комплекты реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» рекомендуется использовать при одновременном исследовании клинического образца на энтеровирусы.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
4. Центрифуга/вортекс.
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
7. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
10. Емкость для сброса наконечников.

<u>При детекции по «конечной точке»:</u>

11. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cycler (Corbett Research, Австралия), MaxyGene (Axygen, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) или аналогичные).
12. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (с плоской крышкой, нестрипованные):
    а) объемом 0,2 мл (например, Axygen, США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл (Gradient Palm Cycler, GeneAmp PCR System 2700, MaxyGene и др.);
    б) объемом 0,5 мл (например, Axygen, США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 мл («Терцик» и др.).

<u>При детекции в режиме «реального времени»:</u>

14. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
15. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
    а) на 0,2 мл (с плоской крышкой, нестрипованные; например, Axygen, США) для постановки в ротор на 36 пробирок – к приборам для ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через дно пробирки (например, Rotor-Gene).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

б) на 0,2 мл (с куполообразной крышкой; например, Axygen, США) – к приборам для ПЦР в режиме «реального времени» с детекцией через крышку (например, iQ5, Mx3000P).

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

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 сут;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 мес;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВАРИАНТ FEP

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для одновременной амплификации фрагментов ДНК *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией **– включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО ДНК *Neisseria meningitidis*-Flu	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК *Haemophilus influenzae*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК *Streptococcus pneumoniae*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ВКО-FL[3]	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

[3] В процессе экстракции ДНК внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО-FL.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- 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, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

В качестве отрицательного контроля выделения (ОК) используют реагент **ОКО**.

Комплекты реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» рекомендуется использовать при одновременном исследовании клинического образца на энтеровирусы.

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.

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

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы (TaqF-ДНК-полимераза), которая активируется при прогреве реакционной смеси при температуре 95 °С в течение 15 мин.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета необходимого числа реакций, включающего тестирование исследуемых и контрольных образцов, согласно расчетной таблице (см. приложение 1). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца ДНК необходимо

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительных контролей (К+), отрицательного контроля (К-) и двух пробирок **«Фон»** для каждого типа смеси). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

1. До начала работы все реагенты набора разморозить, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб и образцов **«Фон»**.
3. Для приготовления реакционных смесей и смесей для образцов **«Фон»** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать одну из **ПЦР-смесей-1 (ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI** или **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae / Haemophilus influenzae*)** и **ПЦР-смесь-2-FRT** согласно приложению 1. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Приготовить 4 пробирки **«Фон»** (по две для каждого типа реакционной смеси). Для этого внести по **15 мкл** приготовленных смесей (без **полимеразы (TaqF)**) в две пробирки **«Фон»**, добавить по **10 мкл ДНК-буфера**, перемешать пипетированием. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
5. В оставшиеся части реакционных смесей добавить **полимеразу (TaqF)** (во все смеси) в количестве, указанном в приложении 1. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемого в реакционную смесь фермента полимеразы (TaqF), указанное в приложении 1, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон» (с вычетом двух пробирок «Фон»).

6. Внести в оставшиеся пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
7. В пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл проб**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, выделенных с помощью комплектов реагентов «ДНК-сорб-В» и «РИБО-сорб», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

8. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
   б) **положительные контроли ПЦР (**К+$_{N.meningitidis}$, К+$_{STI}$**)** – для **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI** внести в подготовленные пробирки по **10 мкл ПКО ДНК *Neisseria meningitidis*-Flu и ПКО STI-88**, соответственно;
   в) **положительные контроли ПЦР (**К+$_{S.pneumoniae}$, К+$_{H.influenzae}$**)** – для **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*** внести в пробирки по **10 мкл ПКО ДНК *Streptococcus pneumoniae* и ПКО ДНК *Haemophilus influenzae,*** соответственно.

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

Б. Проведение амплификации

ВНИМАНИЕ! Амплификацию проводить сразу после соединения реакционной смеси, проб ДНК и контролей. Запуск реакции на приборе должен произойти не позже, чем через 10–15 мин с момента внесения проб в реакционную смесь.

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу амплификации (см. табл. 1).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1

Программа амплификации ДНК (при использовании детекции по «конечной точке»)

	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):						Амплификаторы с матричным регулированием температуры: **Uno-2 (Biometra), MiniCycler, PTC-100 (MJ Research)**		
	GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология»)			**GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cycler (Corbett Research)**					
Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Циклы	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
0	**95**	пауза		**95**	пауза		**95**	пауза	
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	10 с	42	**95**	10 с	42	**95**	1 мин	42
	56	10 с		**56**	25 с		**56**	1 мин	
	72	10 с		**72**	25 с		**72**	1 мин	
3	**72**	1 мин	1	**72**	1 мин	1	**72**	1 мин	1
4	**10**	хранение		**10**	хранение		**10**	хранение	

2. 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 (см. табл. 2).

Таблица 2

Схема соответствия тестируемых патогенов и каналов для флуорофора

Канал для флуорофора	**ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI**	**ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae***
FAM[4]	ДНК ВКО-FL	ДНК *Streptococcus pneumoniae*
JOE[4]	ДНК *Neisseria meningitidis*	ДНК *Haemophilus influenzae*

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш,

[4] Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

прилагаемый к набору реагентов, а также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *N.meningitidis / H.Influenzae / S.pneumoniae*-FL», разработанные ФГУН ЦНИИЭ 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 (см. табл. 3 и методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® *N.meningitidis / H.Influenzae / S.pneumoniae*-FL», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Если значение уровня флуоресценции для пробы находится между пороговыми значениями положительного и отрицательного результата, он расценивается как **невалидный** или **сомнительный** и требует повторения ПЦР-исследования соответствующего исследуемого образца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Сигнал по каналу		Результат
	FAM	JOE	
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI	**Выше** порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена ДНК *Neisseria meningitidis*
	Выше или Ниже порогового значения отрицательного результата	**Выше** порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК *Neisseria meningitidis*
	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Результат **невалидный** - проба требует повторного выделения и тестирования
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*	**Выше** порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлена ДНК *Streptococcus pneumoniae*
	Ниже порогового значения отрицательного результата	**Выше** порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК *Haemophilus influenzae*
	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлены ДНК *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* [5]

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК в соответствии с табл. 4.

[5] При уровне флуоресценции выше порогового значения по каналу FAM на ПЦР-смеси-1-FEP/FRT ***Neisseria meningitidis*** **/ STI**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		Обозначение результата в программах некоторых детекторов
			FAM	JOE	
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI	ОК	Экстракция ДНК	Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	«–» или «ОК»
	К-	ПЦР	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	«нд»
	К+$_{N.meningitidis}$	ПЦР	Ниже порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата	«+» или «ОК»
	К+$_{STI}$	ПЦР	Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения положительного результата	«+» или «ОК»
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*	ОК	Экстракция ДНК	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	«нд»
	К-	ПЦР	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	«нд»
	К+$_{S.pneumoniae}$	ПЦР	Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения положительного результата	«+» или «ОК»
	К+$_{H.influenzae}$	ПЦР	Ниже порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата	«+» или «ОК»

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналам для флуорофоров JOE или FAM ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, у которых сигнал по каналам флуорофоров JOE или FAM был ниже порогового значения положительного результата на соответствующем типе ПЦР-смеси-1.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) (кроме ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI по каналу для флуорофора FAM) и/или отрицательного контроля амплификации (К-) (по всем каналам) сигнал выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа экстракции ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВАРИАНТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации ДНК *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией **– включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО ДНК *Neisseria meningitidis*-Flu	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК *Haemophilus influenzae*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО ДНК *Streptococcus pneumoniae*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем (мл)*	*Кол-во*
ВКО-FL[6]	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.

[6] В процессе экстракции внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО-FL.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Проведение ПЦР-амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используется реагент **ОКО**.

Комплекты реагентов «РИБО-сорб» или «РИБО-преп» рекомендуется использовать при одновременном исследовании клинического образца на энтеровирусы.

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.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. приложение 2). Следует учитывать, что **для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительных контролей (К+) и отрицательного контроля (К-) для каждого типа смеси).** Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

1. До начала работы все реагенты набора разморозить,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для приготовления реакционных смесей необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать одну из **ПЦР-смесей-1 (ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI** или **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae***), **ПЦР-смесь-2-FRT** и **полимеразу (TaqF)** в количестве, указанном в приложении 2. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Внести в отобранные пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей.
5. В подготовленные пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл проб ДНК,** полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, выделенных с помощью комплектов реагентов «ДНК-сорб-В» и «РИБО-сорб», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

6. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
   б) **положительные контроли ПЦР (**К+$_{N.meningitidis}$, К+$_{STI}$**)** – для **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI** внести в пробирки по **10 мкл ПКО ДНК *Neisseria meningitidis*-Flu и ПКО STI-88**, соответственно;
   в) **положительные контроли ПЦР (**К+$_{S.pneumoniae}$, К+$_{H.influenzae}$**)** – для **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*** внести в пробирки по **10 мкл ПКО ДНК *Streptococcus pneumoniae* и ПКО ДНК *Haemophilus influenzae,*** соответственно.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 5).

Таблица 5

Программа амплификации (при использовании детекции в режиме «реального времени»)

	Приборы роторного типа[7]			**Приборы планшетного типа[8]**		
Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	10 с	45	**95**	10 с	45
	56	20 с детекция флуоресц. сигнала		**56**	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с		**72**	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM[9] и JOE[9] (при одновременном проведении нескольких 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 учету 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 для флуорофоров: FAM и JOE.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с

[7] Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q и рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

[8] Например, iCycler iQ, iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» и рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

[9] Название каналов детекции для соответствующего детектора см. в соответствующем разделе методических рекомендаций к набору реагентов.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «*Ct*» в соответствующей графе в таблице результатов.

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 6, методическими рекомендациями по применению набора реагентов для выявления ДНК *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae* в клиническом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® *N.meningitidis / H.influenzae / S.pneumoniae*-FL», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора и вкладышем, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 6

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Значение порогового цикла, *Ct*		Результат
	По каналу для флуорофора FAM	По каналу для флуорофора JOE	
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI	**Меньше** граничного значения	Больше граничного значения	В пробе не выявлена ДНК *Neisseria meningitidis*
	Больше или меньше граничного значения	**Меньше** граничного значения	В пробе выявлена ДНК *Neisseria meningitidis*
	Больше граничного значения	Больше граничного значения	Результат **невалидный** - проба требует повторного перевыделения и тестирования
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* *Haemophilus influenzae*	**Меньше** граничного значения	Больше граничного значения	В пробе выявлена ДНК *Streptococcus pneumoniae*
	Больше граничного значения	**Меньше** граничного значения	В пробе выявлена ДНК *Haemophilus influenzae*
	Больше граничного значения	Больше граничного значения	В пробе не выявлены ДНК *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*[10]

[10] При значении порогового цикла меньше граничного по каналу FAM на ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 7).

Таблица 7

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, *Ct*	
			по каналу для флуорофора FAM	по каналу для флуорофора JOE
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI	ОК	Экстракция ДНК	**Меньше** граничного значения	Больше граничного значения
	К-	ПЦР	Больше граничного значения	Больше граничного значения
	К+$_{N.meningitidis}$	ПЦР	Больше граничного значения	**Меньше** граничного значения
	К+$_{STI}$	ПЦР	**Меньше** граничного значения	Больше граничного значения
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae* / *Haemophilus influenzae*	ОК	Экстракция ДНК	Больше граничного значения	Больше граничного значения
	К-	ПЦР	Больше граничного значения	Больше граничного значения
	К+$_{S.pneumoniae}$	ПЦР	**Меньше** граничного значения	Больше граничного значения
	К+$_{H.influenzae}$	ПЦР	Больше граничного значения	**Меньше** граничного значения

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналам для флуорофоров FAM или JOE больше граничного значения, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых сигнал по каналам для флуорофоров FAM или JOE был больше граничного значения на соответствующем типе ПЦР-смеси-1.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) (кроме ПЦР-смеси-1-FEP/FRT Neisseria meningitidis / STI по каналу для флуорофора FAM) и/или отрицательного контроля этапа ПЦР (К-) (по всем каналам для флуорофоров) сигнал меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа экстракции ДНК.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 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 FEP/FRT-50 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI, ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae / Haemophilus influenzae*, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Neisseria meningitidis* / STI, ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Streptococcus pneumoniae / Haemophilus influenzae* хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® *N.meningitidis / H.influenzae / S.pneumoniae*-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)[11].

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

Главный врач
ФГУЗ «Центр гигиены и Эпидемиологии
в Ярославской области» — Н.Л.Карпов

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией по «конечной точке»

	Объем реагентов на указанное количество реакций (мкл)		
Объем реагента на одну реакцию (мкл)	**10,00**	**5,00**	**0,50**
Число реакций[12]	**ПЦР-смесь-1-FRT**	**ПЦР-смесь-2-FRT**	**Полимераза (TaqF)**
8	**80**	**40**	**3,0**
10	**100**	**50**	**4,0**
12	**120**	**60**	**5,0**
14	**140**	**70**	**6,0**
16	**160**	**80**	**7,0**
18	**180**	**90**	**8,0**
20	**200**	**100**	**9,0**
22	**220**	**110**	**10,0**
24	**240**	**120**	**11,0**
26	**260**	**130**	**12,0**
28	**280**	**140**	**13,0**
30	**300**	**150**	**14,0**
32	**320**	**160**	**15,0**
34	**340**	**170**	**16,0**

[12] Число клинических образцов, контроли этапа экстракции ДНК (N), контроли этапа ПЦР и пробирки «Фон» с запасом на один образец (N+5+1).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

	Объем реагентов на указанное количество реакций (мкл)		
Объем реагента на одну реакцию (мкл)	**10,00**	**5,00**	**0,50**
Число реакций[13]	**ПЦР-смесь-1-FRT**	**ПЦР-смесь-2-FRT**	**Полимераза (TaqF)**
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**

[13] Число клинических образцов, контроли этапа экстракции ДНК (N), контроли этапа ПЦР с запасом на один образец (N+3+1).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru