УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 2.9.10.2012 № 2185-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
«21» сентября 2012 г.

# ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и количественного определения ДНК
*Pseudomonas aeruginosa* в биологическом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

# «АмплиСенс® *Pseudomonas aeruginosa*-скрин-титр-FL»

**АмплиСенс®**

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

IVD

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

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ..... 3
НАЗНАЧЕНИЕ ..... 3
ПРИНЦИП МЕТОДА ..... 3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ..... 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТИСТИКИ ..... 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ..... 5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ ..... 7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..... 8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК/РНК ..... 8
ФОРМАТ FRT ..... 9
СОСТАВ ..... 9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ ..... 10
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ..... 10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ..... 11
А. Подготовка пробирок для амплификации ..... 11
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..... 12
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ..... 13
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ ..... 17
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционной смеси ..... 18
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ ..... 19



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

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|---|---|
| ВКО STI-87 | - внутренний контрольный образец |
| К– | - отрицательный контроль ПЦР |
| В– | - отрицательный контроль экстракции |
| ОКО | - отрицательный контрольный образец |
| 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 |
| *P.aeruginosa* | - *Pseudomonas aeruginosa* |

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *Pseudomonas aeruginosa*-скрин-титр-FL»** предназначен для выявления и количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в клиническом материале (кровь, плазма крови, мазок из ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), мокрота, эндотрахеальный аспират, моча, секрет простаты, спинномозговая жидкость (СМЖ), пунктаты из очагов поражения органов и тканей) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

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

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Pseudomonas aeruginosa* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *Pseudomonas aeruginosa* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе

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



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

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».

В наборе реагентов применяется «горячий старт», что значительно снижает количество неспецифических реакций. «Горячий старт» обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы. Химически модифицированная полимераза (TaqF) активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин.

## 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, «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 и амплификацию ДНК *Pseudomonas aeruginosa* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения амплификации ДНК *Pseudomonas aeruginosa* 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.



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

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТИСТИКИ

### Аналитическая чувствительность

| Вид клинического материала | Комплект для экстракции ДНК | Комплект для амплификации и детекции | Аналитическая чувствитель-ность, копий/мл | Линейный диапазон измерения, копий/мл |
|---|---|---|---|---|
| - Кровь, плазма крови,<br>- мазок из ротоглотки,<br>- БАЛ,<br>- мокрота,<br>- эндотрахеальный аспират,<br>- моча,<br>- секрет простаты,<br>- СМЖ,<br>- пунктаты из очагов поражения органов и тканей | «РИБО-преп» | «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F | 500 | 800 – 10 000 000 |

### Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагмент ДНК *Pseudomonas aeruginosa*. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании бактериальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, а также при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результата методом секвенирования фрагментов амплификации.

Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении ДНК других бактериальных возбудителей (*Enterobacter faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocitogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* и др.), вирусов (*Cytomegalovirus hominis*, *Herpes simplex virus* I и II типа, *Human herpes virus* 6, 7 и 8 типа, *Parvovirus* B19, *Varicella-Zoster virus* и др.)

## 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



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

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 Экстракции (ЗОНА 1), продолжать в Зоне Амплификации и Детекции (ЗОНА 2). 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.



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

- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

**Экстракция ДНК из образцов (ЗОНА 1):**

1. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или 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 магнетизированная силика) (bioMérieux, Франция)) - при работе с формой комплектации 2.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК.
3. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

**Проведение ПЦР и гибридизационно-флуоресцентной детекцей продуктов амплификации (ЗОНА 2):**

4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 от 20 до 200 мкл).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 200 мкл в штативах.
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл.
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 iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
    а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской



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

оптически прозрачной крышкой – 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: кровь, плазма крови, мазок из ротоглотки, БАЛ, мокрота, эндотрахеальный аспират, моча, секрет простаты, СМЖ, пунктаты из очагов поражения органов и тканей.

## ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

**Плазму крови** следует получать центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем отобрать плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2,0 мл. Центрифугировать 1 мл плазмы при 11 тыс об/мин в течение 10-20 мин. Проводить экстракцию ДНК из осадка и 100 мкл надосадочной жидкости.



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

# 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 экстракцию РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли.

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F** – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

| *Реактив* | | *Описание* | *Объем, мл* | *Кол-во* |
|---|---|---|---|---|
| **ПЦР-смесь-1-FRT *P.aeruginosa*** | | 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 |
| **ДНК-буфер** | | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |
| **ДНК-калибраторы** | **К1 *P.aeruginosa*** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |
| | **К2 *P.aeruginosa*** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли.

[2] При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов



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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

| *Реактив* | *Описание* | *Объем, мл* | *Кол-во* |
|---|---|---|---|
| **ОКО** | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |
| **ВКО STI-87** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| **ПКО ДНК *P.aeruginosa*** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,1 | 1 пробирка |

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация 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 и количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Pseudomonas aeruginosa*-скрин-титр-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 работе с формой выпуска набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп».

Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО STI-87 (в каждый образец добавляется 10 мкл **ВКО STI-87**). В пробирку отрицательного контроля экстракции (В–) вносится **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) вносится **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК *P.aeruginosa***.

При использовании автоматической станций для экстракции нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) порядок работы смотри в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в клиническом материале методом



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

полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Pseudomonas aeruginosa*-скрин-титр-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## 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, 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 необходимо проводить постановку пяти контрольных точек этапа амплификации:** два калибратора **(К1 *P.aeruginosa* и К2 *P.aeruginosa*) по два повтора** и отрицательный контроль ПЦР **(ДНК-буфер)**. Кроме того, необходимо брать реагенты **с запасом**: рассчитывать на одну реакцию больше.
3. В отдельной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FRT *P.aeruginosa* и заранее подготовленную смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).** Расчет производить исходя из того, что на каждую постановку ПЦР идет:
   - **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *P.aeruginosa.***
   - **5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).**



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

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 или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
   б) **ДНК-калибраторы** – в две пробирки внести по **10 мкл** калибратора **К1 *P.aeruginosa*** и в две пробирки внести по **10 мкл** калибратора **К2 *P.aeruginosa***.
   в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.
   г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – внести в пробирку **10 мкл** ДНК, выделенной из **ПКО ДНК *P.aeruginosa***.

**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)



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

Таблица 1

**Программа «АмплиСенс-1»**

| | Приборы роторного типа[3] | | | Приборы планшетного типа[4] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Цикл** | **Температура, °С** | **Время** | **Кол-во циклов** | **Температура, °С** | **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/Green и JOE/Yellow/HEX.

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 поводят 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** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК ВКО (ВКО STI-87)**.
- по каналу для флуорофора **JOE** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *Pseudomonas aeruginosa*.**

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

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

[4] Например, iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.



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

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

На основании значений порогового цикла *Ct* (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и исходя из заданных значений калибраторов К1 *P.aeruginosa* и К2 *P.aeruginosa*, указанных во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов, происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий ДНК ПКО (по каналу JOE/Yellow/HEX) и ВКО (по каналу FAM/Green) в пробе ПЦР. Полученные значения используют для расчета концентрации ДНК ***Pseudomonas aeruginosa*** в исследуемых и контрольных образцах по формулам:

– **расчет концентрации ДНК *Pseudomonas aeruginosa* на мл образца при экстракции из 100 мкл:**

$$\frac{\text{Число копий ДНК } P.aeruginosa \text{ в пробе ПЦР}}{\text{Число копий ДНК ВКО в пробе ПЦР}} \times \text{коэффициент ВКО (копий/мл)} = \text{копий/мл}$$

– **расчет концентрации ДНК *Pseudomonas aeruginosa* на мл образца при экстракции из объемов, более чем 100 мкл:**

$$\frac{\text{Число копий ДНК } P.aeruginosa \text{ в пробе ПЦР}}{\text{Число копий ДНК ВКО в пробе ПЦР}} \times n \times \text{коэффициент ВКО (копий/мл)} = \text{копий/мл}$$

$$n = \frac{100}{\text{объем экстракции, мкл}}$$

**ВНИМАНИЕ! Коэффициент ВКО** указывается во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов данной серии.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК *Pseudomonas aeruginosa* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/Yellow/HEX** определено значение порогового цикла *Ct* и расчетная концентрация больше или равна указанному значению. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Pseudomonas aeruginosa* **не обнаружена,** если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE/Yellow/HEX** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) или расчетная концентрация меньше указанного



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

значения, а в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM/Green** определено значение порогового цикла *Ct* и расчетная концентрация больше указанного значения.

- Результат анализа **невалидный,** если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **JOE/Yellow/HEX**, и по каналу для флуорофора FAM/Green значение *Ct* также не определено (отсутствует) или расчетная концентрация меньше указанного значения. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Линейный диапазон измерения набора реагентов: 800 – 10 000 000 копий/мл. Если результат больше, чем 10 000 000 копий/мл, то он выдается как ***результат более 10 000 000 копий/мл.*** Если результат меньше, чем 800 копий/мл, то он выдается как ***результат менее 800 копий/мл***.

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения концентраций указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов данной серии.

**Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательного и положительных контролей амплификации, а также отрицательного и положительного контролей экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 2)**.

Таблица 2

**Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования**

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Результаты амплификации по каналу | |
|---|---|---|---|
| | | FAM/Green | JOE/Yellow/HEX |
| **В–** | Экстракция ДНК | Определено значение больше граничного | Определено значение меньше граничного |
| **ПК** | Экстракция ДНК, ПЦР | Определено значение больше граничного | Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше |
| **К–** | ПЦР | Значение отсутствует | Значение отсутствует |
| **К1 *P.aeruginosa*<br>К2 *P.aeruginosa*** | ПЦР | Определено значение *Ct* и расчетная концентрация | Определено значение *Ct* и расчетная концентрация |

**ВНИМАНИЕ!**

1. Если для пробы получен **невалидный** результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа



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

экстракции.

2. Отсутствие положительного сигнала в калибраторах может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз для всех образцов.
3. Если в отрицательном контроле экстракции (В–) по каналу JOE/Yellow/HEX определена концентрация больше указанного значения или для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам FAM/Green и/или JOE/Yellow/HEX зафиксировано значение порогового цикла *Ct*, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.
4. Для исследуемого образца зафиксирован положительный результат, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Это может свидетельствовать о неправильно заданном уровне пороговой линии или параметров расчета базальной линии. Такой результат не должен рассматриваться как положительный. Если он получен при правильном уровне пороговой линии, требуется повторно провести ПЦР для этого образца.



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. 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 разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

**Хранение.** Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *P.aeruginosa* хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-1-FRT *P.aeruginosa*, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

Рекламации на качество набора реагентов «**АмплиСенс®** ***Pseudomonas aeruginosa*-скрин-титр-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

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
Управления делами Президента Российской Федерации — Е.Л.Никонов

[5] 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 реакционной смеси

| | Объем реактивов на указанное количество реакций | |
|---|---|---|
| Объем реагентов на одну реакцию (мкл) | 10,0 | 5,0 |
| Число клинических образцов | ПЦР-смесь-1-FRT *P.aeruginosa*[6] | Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)[6] |
| 1 | 70 | 35 |
| 2 | 80 | 40 |
| 3 | 90 | 45 |
| 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 |

[6] Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки пяти контрольных точек (2 ДНК-калибратора К1 *P.aeruginosa*, К2 *P.aeruginosa* (по два повтора) и отрицательный контроль ДНК-буфер).



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

## 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



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