Приказом Росздравнадзора
от 29.06.12 № 3175-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
«30» ноября 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

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 ХАРАКТЕРИСТИКИ 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК 8
ФОРМАТ FRT 11
СОСТАВ 11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 13
А. Подготовка пробирок для амплификации 13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 14
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 18
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей 19
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 20

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО Glob	- эндогенный внутренний контрольный образец
К–	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- 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 заболевания[1].

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 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

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

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».

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.

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

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 auzontiag, P.brevicompactum*; *Ulocladium boffcytus*; *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

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

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.

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

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, Axygen, США).
4. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (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, Axygen, 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 гибридизационно-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 для выделенных проб ДНК.
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

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

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

— **<u>бронхоальвеолярный лаваж, аспираты из ротоглотки и трахеи</u>**

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,

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

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.

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

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.

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 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 *P.jirovecii* / 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 *P.jirovecii* 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

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

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 ДНК *Pneumocystis jirovecii (carinii)* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-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 ОКО**.

При работе с формой выпуска набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп».

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

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

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

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).

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 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

[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.

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

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* (ВКО Glob)**;
- по каналу для флуорофора **JOE** сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации участка **ДНК *Pneumocystis jirovecii (carinii).***

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 *Ct* 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 *Ct,* 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 *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора JOE и по каналу для флуорофора FAM значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает значение, указанное во вкладыше. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

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

- Для клинических образцов, в которых значения *Ct* по каналу JOE превышают порог, указанный во вкладыше, результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения *Ct* результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений результат считать сомнительным.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* 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 гибридизационно-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, *Ct***	
		по каналу для флуорофора FAM	**по каналу для флуорофора JOE**
ОК	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	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 (К-) и для отрицательного контроля этапа экстракции (ОК) – 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 (К+) 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

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

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 необходимо провести повторный анализ данного образца начиная с этапа экстракции. Высокие значения *Ct* могут быть вызваны потерями ДНК при экстракции или наличием ингибиторов.

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. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукомплектовать 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.

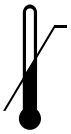
Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей

Количество исследуемых клинических образцов с учетом контролей	ПЦР-смесь-1-FRT *P.jirovecii* / 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

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
LOT	Код партии		Максимальное число тестов
IVD	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
VER	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