УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 29.10.12г. № 2163-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
«25» июня 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *MRSA*-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. 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК 9
ФОРМАТ FRT 10
СОСТАВ 10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 11
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 12
А. Подготовка пробирок для амплификации 12
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 13
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 14
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 18
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 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 STI-87	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
В–	- отрицательный контроль экстракции
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
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»
MRCoNS	- метициллин-резистентные коагулазонегативные *Staphylococcus* spp.
MRSA	- метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*
MSSA	- метициллин-чувствительный *Staphylococcus aureus*
MRSspp.	- метициллин-резистентные *Staphylococcus* spp.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *MRSA*-скрин-титр-FL»** предназначен для выявления и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. в биологическом материале (мазок из ротоглотки, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), мокрота, эндотрахеальный аспират, промывные воды бронхов, моча (осадок первой порции), кровь, плазма крови, спинномозговая жидкость (СМЖ), пунктаты из очагов поражения органов и тканей, смывы с медицинского оборудования, инструментария и инвентаря) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК при помощи полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией основано на амплификации участка ДНК микроорганизма при помощи специфичных к данному участку ДНК праймеров. Наличие в реакционной смеси олигонуклеотидных зондов, меченных флуоресцентными красителями,

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

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

позволяет проводить гибридизационно-флуоресцентную детекцию продукта амплификации без открывания пробирок после ПЦР. Регистрация флуоресцентного сигнала проводится непосредственно в ходе ПЦР, с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени». Набор реагентов содержит внутренний контрольный образец, который добавляется в каждую исследуемую пробу на этапе экстракции ДНК, что позволяет контролировать процедуру анализа каждого образца. 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 100 и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 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 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения амплификации 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! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл	Линейный диапазон измерения, копий/мл
- Мазок из ротоглотки, - БАЛ, - мокрота, - эндотрахеальный аспират, - промывные воды бронхов, - моча[2], - кровь, плазма крови, - СМЖ, - пунктаты из очагов поражения органов и тканей, - смывы с медицинского оборудования, инструментария и инвентаря	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F	400	800 – 10 000 000

Аналитическая специфичность

Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании бактериальных штаммов *Staphylococcus aureus*, в том числе *MRSA*, а также при исследовании биологического материала с последующим подтверждением результата методом секвенирования фрагментов амплификации.

Аналитическая специфичность изучена на следующих штаммах и изолятах: *Chlamydophila pneumonia*, *Escherichia coli*, *Haemophilus haemolyticus*, *H.influenzae*, *H.parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *K.pneumonia*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumonia*, *Neisseria cinereae*, *N.elongata*, *N.flavescens*, *N.gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N.mucosa*, *N.sicca*, *N.subflava*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus agalactiae*, *S.milleri*, *S.mitis*, *S.mutans*, *S. pneumoniae*, *S.pyogenes*, *S.salivarius*, *S.sanguis*, *S.suis*, *S.viridans*, а также на геномной ДНК человека. Неспецифических реакций при тестировании штаммов с помощью набора реагентов выявлено не было.

[2] Требуется предобработка образцов мочи.

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду

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

(пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Зона 1. Экстракция ДНК из образцов

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. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
3. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс g (например, Elmi, Латвия; Hettish, Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
7. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например,

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

«Ленпипет», Россия).

8. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 и до 1000 мкл (например, Axygen, США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 и 200 мкл.
11. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, Axygen, США).
12. При использовании автоматических станций для выделения нуклеиновых кислот: автоматическая станция для выделения РНК/ДНК (например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
13. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Зона 2. Проведение амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов

16. 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) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
17. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
18. Центрифуга/вортекс.
19. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
20. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
21. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
22. 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 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.

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

23. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
24. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
25. Емкость для сброса наконечников.

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: мазок из ротоглотки, БАЛ, мокрота, эндотрахеальный аспират, промывные воды бронхов, моча (осадок первой порции), кровь, плазма крови, СМЖ, пунктаты из очагов поражения органов и тканей, смывы с медицинского оборудования, инструментария и инвентаря.

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 течении 10-20 мин. Проводить экстракцию 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 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	*Описание*	*вариант 100*	
		Объем, мл	*Кол-во*
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета[3]	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив		*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FRT *MRSA*		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	**К1 *MRSA***	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	К2 *MRSA*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

[3] 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

ФОРМАТ FRT

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
ПКО ДНК MRSA	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 метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *MRSA*-скрин-титр-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. При работе с формой комплектации набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп».

Экстракция ДНК из каждого биологического 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–) внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК *MRSA***.

В случае экстракции ДНК при помощи автоматической станции NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) порядок работы см. в в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного

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

Staphylococcus aureus, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *MRSA*-скрин-титр-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

1. Предварительно необходимо подготовить **смесь ПЦР-смеси-2-FRT** и **полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (60 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-смесью-2-FRT (600 мкл)**, аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены, и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с). Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на исследование 120 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 ДНК-калибратора (К1 *MRSA* и К2 *MRSA*) в двух повторах** и **отрицательный контроль (ДНК-буфер)**. Кроме того, необходимо брать реагенты **с запасом**: для тестирования N образцов приготовить реагенты для (N+1) реакций.
3. В отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь-1-FRT *MRSA* 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 *MRSA***

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

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

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

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной реакционной смеси.
6. В пробирки с реакционной смесью добавить 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 *MRSA*** и в две пробирки внести по **10 мкл** калибратора **К2 *MRSA***.
   в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из **ОКО**.
   г) **положительный контроль экстракции (ПК)** – в пробирку внести **10 мкл** ДНК, выделенной из **ПКО ДНК *MRSA*.**

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 согласно описанию для данного прибора (см. табл. 1а и 1б).

Таблица 1а

Программа амплификации «MRSA» для приборов роторного типа[4]

Этап	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Кол-во циклов*
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование	95	15 с	–	5
	60	30 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование	95	15 с	–	40
	55	30 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	15 с	–	

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

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

Таблица 1б

Программа амплификации «MRSA» для приборов планшетного типа[5]

Этап	*Температура, °С*	*Время*	*Измерение флуоресценции*	*Кол-во циклов*
1	95	15 мин	–	1
2	95	15 с	–	5
	55	30 с	–	
	72	15 с	–	
3	95	15 с	–	40
	55	30 с	FAM, HEX/JOE, ROX	
	72	15 с	–	

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 в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- по каналу для флуорофора FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Staphylococcus aureus*,
- по каналу для флуорофора JOE (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *mecA*, расположенного на хромосоме *Staphylococcus aureus* и ряда других стафилококков, в специфической области, обнаруживаемой только у метициллин-резистентных штаммов,
- по каналу для флуорофора ROX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО (ВКО STI-87).

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

[5] Например, iCycler iQ, 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

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

Принцип интерпретации результатов представлен в табл. 2.

Таблица 2

Интерпретация результатов и количественный расчет для исследуемых образцов

Канал			Результат (расчет концентрации, копий/мл)
FAM (*S.aureus*)	JOE (ген mec A)	ROX (ВКО)	
+	–	+/–	***MSSA*** **(= (A/C)*коэффициент ВКО*N)**
–	+	+/–	***MRCoNS*** **(= (B/C)*коэффициент ВКО*N)**
+	+	+/–	**Рассчитать десятичный логарифм A и B.** **1)** Если **A** отличается от **B** не более, чем на **0,3 lg**, то результат ***MRSA*** **(= (B/C)*коэффициент ВКО*N)** **2)** Если **A** отличается от **B** более чем на **0,3 lg**, то результат ***MRSspp.*** **(*MRSA* и *MRCoNS*) (= (B/C)*коэффициент ВКО*N)**
–	–	–	**Невалидный**
–	–	+	**Не обнаружено**

где **A** - расчетная концентрация по каналу для флуорофора FAM/Green,

B - расчетная концентрация по каналу для флуорофора JOE/HEX/Yellow,

C - расчетная концентрация по каналу для флуорофора ROX/Orange.

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

ВНИМАНИЕ! Коэффициент ВКО указывается во вкладыше к данной серии набора реагентов и не может быть использован для расчета результатов, полученных при анализе с использованием реагентов других серий.

– **ДНК *MSSA* (метициллин-чувствительный *Staphylococcus aureus*) обнаружена,** если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофора **FAM** определено значение порогового цикла *Ct*, а по каналу для флуорофора **JOE** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию). Расчет концентрации проводится по формуле:

(A/C)*коэффициент ВКО*N = (копий/мл образца).

– **ДНК *MRCoNS* (метициллин-резистентные коагулазонегативные *Staphylococcus* spp.) обнаружена,** если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофора **JOE** определено значение порогового цикла *Ct*, а по каналу для флуорофора **FAM** не определено (отсутствует) значение порогового

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

цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию). Расчет концентрации проводится по формуле:

(B/C)*коэффициент ВКО*N = (копий/мл образца).

– **ДНК *MRSA* (метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*) обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров **FAM** и **JOE** определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривые флуоресценции данной пробы должны пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, а десятичный логарифм расчетной концентрации по каналам для флуорофоров **FAM** и **JOE** отличается не более чем на **0,3** (см. табл. 2). Расчет концентрации проводится по формуле:

(B/C)*коэффициент ВКО*N = (копий/мл образца).

Если десятичный логарифм расчетной концентрации по каналу для флуорофора **FAM** отличается от расчетной концентрации по каналу для флуорофора **JOE** более, чем на **0,3**, то выдается результат «**ДНК *MRSspp.* (*MRSA* и *MRCoNS*) (метициллин-резистентные *Staphylococcus* spp., в том числе метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* и метициллин-резистентные коагулазонегативные *Staphylococcus* spp.)**». Расчет концентрации проводится по формуле:

(B/C)*коэффициент ВКО*N = (копий/мл образца).

– **Результат анализа невалидный,** если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофору **FAM** и по каналу для флуорофору **JOE**, и по каналу для флуорофора **ROX** значение *Ct* также не определено (отсутствует) или расчетное значение меньше указанного во вкладыше. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего биологического 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! Значения концентраций калибраторов указываются во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для отрицательного контроля амплификации и положительного и отрицательного контролей экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 3).

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

Таблица 3

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап анализа	Результаты амплификации по каналу		
		FAM/Green	**JOE/HEX/ Yellow**	**Orange/ Rox**
В–	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Определено значение больше граничного*
ПК	Экстракция ДНК, ПЦР	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Определено значение больше граничного*
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К1 *MRSA*, К2 *MRSA*	ПЦР	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация

* Граничные значения концентраций указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ!

1. Если для пробы получен **невалидный** результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего биологического образца.
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 каналам FAM и/или JOE, или в отрицательном контроле ПЦР (К–) по любому из каналов FAM, JOE, ROX детектируется положительный сигнал, 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. «ПЦР-комплект» при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *MRSA*-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)[6].

Заведующий НПЛ ОМДиЭ Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1» Е.Л.Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

[6] 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 биологических образцов	ПЦР-смесь-1-FRT *MRSA*[7]	Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)[7]
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

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

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