Приказом Росздравнадзора
от 29.06.12 г № 3176-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 и количественного определения
ДНК *Streptococcus agalactiae* в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Streptococcus agalactiae*-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 ХАРАКТЕРИСТИКИ 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК/РНК 8
ФОРМАТ FRT 9
СОСТАВ 9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 10
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 20
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей 21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 22

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПКО	– положительный контрольный образец
ВКО STI-87	– экзогенный внутренний контрольный образец
ВКО Glob	– эндогенный внутренний контрольный образец
ОКО	– отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контроль ПЦР
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПК	- положительный контроль экстракции
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

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *Streptococcus agalactiae*-скрин-титр-FL»** предназначен для выявления и количественного определения ДНК *Streptococcus agalactiae* в клиническом материале (плазма крови, спинномозговая жидкость (СМЖ), мазок из ротоглотки, соскоб эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища, аноректальный мазок) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК при помощи полимеразной цепной реакции основано на амплификации участка ДНК микроорганизма при помощи специфичных к данному участку ДНК праймеров. Наличие в реакционной смеси олигонуклеотидных зондов, меченых флуоресцентными красителями, 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». Экстракция ДНК из бесклеточных биологических сред (плазмы крови, СМЖ) проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. При экстракции ДНК из клинического материала, содержащего клетки, происходит амплификация участка ДНК генома человека (эндогенный

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

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

внутренний контроль). Эндогенный внутренний контроль (ВКО Glob) позволяет не только контролировать этапы ПЦР-анализа (экстракцию ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность забора материала и его хранения. 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 одном формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «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 ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК/РНК, 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 экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, копий/мл	Линейный диапазон измерения, копий/мл
Плазма крови, СМЖ, мазок из ротоглотки, соскоб эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища, аноректальный мазок	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F	$3x10^2$	1000-10.000.000

Аналитическая специфичность

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

Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении ДНК других бактериальных возбудителей (*Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Neisseria meningitidis, Haemophilus parainfluenzae, Listeria monocitogenes, Klebsiella pneumoniae* 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 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 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

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

(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, 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

1. Комплект реагентов для экстракции 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. При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот: автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция)).
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплектом» вариант FRT-100 F – от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, 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 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.

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

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: плазма крови, СМЖ, мазок из ротоглотки и соскоб эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища, аноректальный мазок.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК/РНК

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» на 1,5-2,0 мл. Центрифугировать 1 мл плазмы при 11 тыс об/мин в течение 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*	*Объем, мл*	*Кол-во*
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета[2]	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 экстракцию 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 *Streptococcus agalactiae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив		*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *Streptococcus agalactiae*		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
ТЕ-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	**K1 *SAG***	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	K2 *SAG*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы. Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

[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

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПКО ДНК *Streptococcus agalactiae* и ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Streptococcus agalactiae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Streptococcus agalactiae*-скрин-титр-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. При работе с формой выпуска набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «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 (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО** и **10 мкл ПКО ДНК *Streptococcus agalactiae* и ДНК человека**.

В случае экстракции ДНК при помощи автоматической станции NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) порядок работы см. в «Методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Streptococcus agalactiae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Streptococcus agalactiae*-скрин-титр-FL».

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, объем пробы ДНК – 10 мкл.

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

   ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на 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 ДНК в качественном формате необходимо проводить постановку двух контрольных точек этапа амплификации ПЦР: положительный (ДНК-калибратор **K2 *SAG***) и отрицательный контроль ПЦР (**ТЕ-буфер**), а в количественном формате необходимо проводить постановку пяти контрольных точек этапа амплификации ПЦР: два калибратора (**K1 *SAG*** и **K2 *SAG***) по два повтора и отрицательный контроль ПЦР (**ТЕ-буфер**). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом и рассчитывать на одну реакцию больше.

3. В отдельной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FL *Streptococcus agalactiae*** 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-FL *Streptococcus agalactiae;***

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

   Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование

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

исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице**, приведенной в **Приложении** 1.

ВНИМАНИЕ! При одновременном исследовании **120** образцов возможна упрощенная схема приготовления смеси: все содержимое одной пробирки с ПЦР-смесью-2-FRT и одной пробирки с полимеразой (TaqF) перенести в пробирку с ПЦР-смесью-1-FL *Streptococcus agalactiae*.

4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок выбрать в зависимости от используемого прибора.
5. Раскапать в пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл** исследуемой ДНК, полученных в результате экстракции из клинических или контрольных образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
   - для проведения качественного анализа:
     а) в пробирку **отрицательного контроля ПЦР** (**K–**) внести **10 мкл ТЕ-буфера**.
     б) в пробирку **положительного контроля ПЦР** (**K+**) внести **10 мкл** ДНК-калибратора **K2 *SAG***.
   - для проведения количественного анализа:
     а) в пробирку **отрицательного контроля ПЦР** (**K–**) внести **10 мкл ТЕ-буфера**.
     б) внести в две пробирки по **10 мкл** ДНК-калибратора **K1 *SAG*** и в две пробирки по **10 мкл** ДНК-калибратора **K2 *SAG***.

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. 1а и 1б).

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

Таблица 1а

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа[3]

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/Удерж. темп-ры	**95**	15 мин	–	1
Cycling 1/ Циклирование	**95**	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
Cycling 2/ Циклирование	**95**	5 с	–	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	15 с	–	

Таблица 1б

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа[4]

Этап	Температура, °С	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	**95**	15 мин	–	1
2	**95**	5 с	–	5
	60	20 с	–	
	72	15 с	–	
3	**95**	5 с	–	40
	60	30 с	FAM, 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 интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов поводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени». Анализируют результаты амплификации по трем 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 регистрируется сигнал, свидетельствующий о

[3] Например, Rotor-Gene 3000 и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).
[4] Например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США).

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

накоплении продукта амплификации **ДНК *Streptococcus agalactiae***;

- по каналу для флуорофора **ROX** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации участка **ДНК ВКО (ВКО STI-87)**.

При экстракции ДНК из мазков из ротоглотки, соскобов эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища, аноректальных мазков учитываются результаты 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 – ДНК *Streptococcus agalactiae.***

При экстракции ДНК из плазмы крови, СМЖ учитываются результаты по двум каналам: по каналу для флуорофора **JOE – ДНК *Streptococcus agalactiae*,** по каналу для флуорофора **ROX**– сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации участка **ДНК ВКО (ВКО STI-87).**

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 при экстракции ДНК из плазмы крови, СМЖ:

- ДНК *Streptococcus agalactiae* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающего порога, указанного во вкладыше. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Streptococcus agalactiae* **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 **ROX** определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее порог, указанный во вкладыше.
- Результат анализа **невалидный,** если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора **JOE**, и по каналу для флуорофора **ROX** 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 для флуорофора **JOE** превышают порог, указанный во вкладыше, результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное ПЦР-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 считается **сомнительным**.

Результат ПЦР-исследования считается достоверными, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей экстракции ДНК и ПЦР (см. табл. 2). Для количественного теста результаты по ПКО должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования при экстракции ДНК из плазмы крови, СМЖ

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
		JOE		ROX	
		Качествен-ный формат	Количествен-ный формат	Качественный формат	Количествен-ный формат
ОК	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
ПК	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	-	Определено значение меньше граничного	-
К1 *SAG*, К2 *SAG*	ПЦР	-	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация	-	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация

Принцип интерпретации результатов при экстракции ДНК из мазков из ротоглотки и соскобов эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища, аноректальных мазков:

– ДНК *Streptococcus agalactiae* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение порогового

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

цикла *Ct*, не превышающего порога, указанного во вкладыше. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- ДНК *Streptococcus agalactiae* **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** для качественного формата значение порогового цикла *Ct* не превышает указанное во вкладыше, а для количественного формата – количество геномных эквивалентов человека (**ВКО Glob**) на реакцию более **500**.
- 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** для качественного формата значение *Ct* больше указанного во вкладыше, а для количественного формата – количество геномных эквивалентов человека на реакцию не превышает **500**. В этом случае требуется повторно провести исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Для клинических образцов, в которых значения *Ct* по каналу для флуорофора **JOE** превышают порог, указанный во вкладыше, результат считается **сомнительным**. Необходимо провести дополнительное ПЦР-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 считается **сомнительным**.

Результат ПЦР-исследования считается достоверными, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей экстракции ДНК и ПЦР (см. табл. 3). Для количественного теста результаты по ПКО должны укладываться в диапазон концентраций, указанный во вкладыше к набору реагентов.

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

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования при экстракции ДНК из мазков из ротоглотки, соскобов эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища аноректальных мазков

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
		JOE		FAM	
		Качественный формат	Количественный формат	Качественный формат	Количественный формат
ОК	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
ПК	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Значение укладывается в границы, указанные во вкладыше	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	-	Определено значение меньше граничного	-
K1 *SAG*, K2 SAG	ПЦР	-	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация	-	Определено значение *Ct* и расчетная концентрация

Для количественного теста расчет концентрации ДНК *Streptococcus agalactiae* на мл образца при экстракции из 100 мкл провести по формуле:

Расчетная концентрация ДНК Streptococcus agalactiae x 100 = *копии/мл.*

Возможные ошибки:

1. Если для пробы получен **невалидный** результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего клинического 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 (ОК) по каналу для флуорофора **FAM** и/или **JOE** или в отрицательном контроле ПЦР (К–) по каналам для флуорофора **FAM** и/или JOE и/или ROX детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае требуется повторить анализ положительных проб, начиная с этапа экстракции, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.
4. Для исследуемого образца зафиксирован положительный результат, при этом на

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

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-FL *Streptococcus agalactiae*, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Streptococcus agalactiae* хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Streptococcus agalactiae*-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

Зав. Лабораторией микробиологии
НИИАГ им. Д.О.Отта СЗО РАМН
д.м.н, профессор — А.М.Савичева

[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

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

* Значения приведены с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки пяти контрольных точек (2 ДНК-калибратора К1 *SAG* и К2 *SAG* (по два повтора) и отрицательный контроль ТЕ-буфер) для количественного определения ДНК *Streptococcus agalactiae* и двух контрольных точек (положительного и отрицательного контроля) для качественного определения ДНК *Streptococcus agalactiae.*

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	Σ	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