

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека (ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии Роспотребнадзора)

В.Г. Акимкин

2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики *in vitro*

АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* / tox- genes-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	5
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ.....	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	14
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	18
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	18
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	19
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	19
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50).....	21
СОСТАВ.....	21
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	21
А. Подготовка проб для амплификации.....	21
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»...	22
В. Анализ и интерпретация результатов.....	23
ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F).....	28
СОСТАВ.....	28
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	28
А. Подготовка проб для амплификации.....	28
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»...	29
В. Анализ и интерпретация результатов.....	31
ФОРМА 3 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L).....	36
СОСТАВ.....	36
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	36
А. Подготовка проб для амплификации.....	36
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»...	37
В. Анализ и интерпретация результатов.....	38
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	43
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	44
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	45
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	46

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
К–	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
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 для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* / tox-genes-FL, далее – набор реагентов, предназначен для качественного определения ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и обнаружения генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans* в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мазки с пораженных участков кожи) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания. Набор реагентов может быть использован с целью скрининга носительства *C. diphtheriae*, а также в целях исключения диагноза

«Дифтерия» или постановки предварительного диагноза «Дифтерия». Следует иметь в виду, что некоторые *C.diphtheriae*, имеющие ген токсина, не способны продуцировать токсин (не являются токсигенными). В связи с этим, после получения положительных результатов ПЦР-исследования (обнаружение ДНК *C.diphtheriae* и гена токсина *C.diphtheriae*), токсигенность *C.diphtheriae* необходимо дополнительно подтверждать с использованием других лабораторных методов, в соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на дифтерийную этиологию заболевания (ларинготрахеит, ларингит, круп); от лиц больных ангинами с патологическим выпотом на миндалинах, с подозрением на заглоточный (паратонзиллярный) абсцесс; инфекционный мононуклеоз; стенозирующий ларинготрахеит; от лиц, бывших в контакте с источником инфекции (по эпидемическим показаниям); от лиц, вновь поступающих в специализированные учреждения длительного пребывания для детей и взрослых (с профилактической целью) (Эпидемиологический надзор за дифтерийной инфекцией. Методические указания. МУ 3.1.3018-12).

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, 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 с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов в форме 2 содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридинтрифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся четыре реакции – амплификация специфических участков ДНК гена *rpoB Corynebacterium diphtheriae*, гена, кодирующего токсин *Corynebacterium diphtheriae*, гена, кодирующего токсин *Corynebacterium ulcerans*, а также ДНК ВКО-FL. Результаты амплификации регистрируются по четырем различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
ДНК-мишень	ДНК ВКО-FL	ДНК токсина <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	ДНК <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	ДНК токсина <i>Corynebacterium ulcerans</i>
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	gene <i>tox C. diphtheriae</i>	gene <i>rpoB</i>	gene <i>tox C. ulcerans</i>

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Форма 3: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 1, 2, 3 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Изготовителем.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма 2 рассчитана на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли. Форма 3 рассчитана на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Возбудитель	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность, (предел обнаружения), ГЭ/мл ¹
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, пораженных участков кожи	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50, FRT-100 F, FRT-L	1000
	Ген токсина <i>Corynebacterium diphtheriae</i>			
	Ген токсина <i>Corynebacterium ulcerans</i>			

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Воспроизводимость исследования

Воспроизводимость исследования была изучена в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах. Тестирование проводили на образцах, содержащих ДНК *C.diphtheriae*, ДНК гена *tox C.diphtheriae* и ДНК гена *tox C.ulcerans*. Конечная концентрация каждого составила 1×10^3 ГЭ/мл. Для всех повторов исследуемых образцов результаты обнаружения заявленных фрагментов ДНК совпали.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает заявленные фрагменты ДНК микроорганизмов при исследовании следующих штаммов из коллекции NCTC[®] (National Collection of Type Cultures Diphtheriae Reference Laboratory, Central Health Laboratory (CPHL), Великобритания) в концентрации не более 1×10^3 ГЭ/мл:
- *Corynebacterium diphtheriae* NCTC[®] №10356 (tox-) – ДНК

¹ Количество геномных эквивалентов (ГЭ) микроорганизма в 1 мл исследуемого материала.

- C.diphtheriae* обнаружена, ДНК генов, кодирующих токсины *C.diphtheriae* и *C.ulcerans*, не обнаружена;
- *Corynebacterium diphtheriae* NCTC® №10648 (tox+) – ДНК *C.diphtheriae* и ДНК гена, кодирующего токсин *C.diphtheriae* обнаружена, ДНК гена, кодирующего токсин *C.ulcerans*, не обнаружена;
 - *Corynebacterium ulcerans* NCTC® №7910 (tox+) – ДНК гена, кодирующего токсин *C.ulcerans* обнаружена, ДНК *C.diphtheriae* и гена, кодирующего токсин *C.diphtheriae*, не обнаружена.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов, а также геномной ДНК человека:

1. Штаммы из коллекции АТСС® (American Type Culture Collection, США) и ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: *Corynebacterium xerosis* АТСС® 7711D-5™, *Corynebacterium urealyticum* АТСС® 43044™, *Corynebacterium amycolatum* АТСС® 49368™, *Corynebacterium jeikeium* АТСС® 43734™, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* 25;
2. Штаммы из коллекций АТСС® (American Type Culture Collection, США), NCTC® (National Collection of Type Cultures, Великобритания) и ГКПМ (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл: *Bordetella pertussis* 703 L 6, *Streptococcus pneumoniae* АТСС® 49619™, *Streptococcus agalactiae* АТСС® 13813™, *Streptococcus pyogenes* Dick – I, *Staphylococcus saprophyticus* АТСС® 15305™, *Haemophilus influenzae* 423, *Proteus mirabilis* 3177, *Klebsiella pneumoniae* 418, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС® 9027™, *Neisseria flava* АТСС® 14221™, *Neisseria sicca* 5, *Neisseria mucosa* АТСС® 19693™, *Escherichia coli* M 17, *Salmonella enteritidis* 5765, *Salmonella typhimurium* 79, *Moraxella catarrhalis* АТСС® 8193™, *Yersinia enterocolitica* 134, *Enterococcus faecalis* NCTC® 775, *Staphylococcus aureus* АТСС® 6538-P, *Mycobacterium bovis* Ravenel 700204.
3. ДНК человека в концентрации 1 мг/мл.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих соединениях указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 3

Результаты тестирования набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* / tox-genes-FL в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения АмплиСенс® <i>Corynebacterium diphtheriae</i> / tox-genes-FL		Результаты применения референтного метода ²	
			положительных	отрицательных
Мазки со слизистой оболочки носоглотки	Всего исследовано 300 образцов	положительных	150	0
		отрицательных	0	150
Мазки с пораженных участков кожи	Всего исследовано 300 образцов	положительных	150	0
		отрицательных	0	150

Таблица 4

Результативность применения набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Corynebacterium diphtheriae* / tox-genes-FL

Тип образцов	Описание образцов	Количество образцов, шт.	Результат	
			положительных	отрицательных
Мазки со слизистой оболочки носоглотки	Биологический материал, содержащий ДНК <i>C.diphtheriae</i> и гена токсина <i>C.diphtheriae</i>	50	50	0
	Биологический материал, содержащий ДНК <i>C.diphtheriae</i> и не содержащий ДНК гена токсина <i>C.diphtheriae</i>	50	50	0

² В качестве референтного метода использовался Набор реагентов «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» Тест-система биохимическая для дифференциации микроорганизмов рода коринебактерий, в том числе возбудителя дифтерии, и определения его токсигенных свойств по ТУ 9398-061-05941003-2010, РУ № ФСР 2010/07815.

Тип образцов	Описание образцов	Количество образцов, шт.	Результат	
			положительных	отрицательных
	Биологический материал, содержащий ДНК гена токсина <i>C.ulcerans</i>	50	50	0
	Биологический материал, не содержащий ДНК <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена токсина <i>C.diphtheriae</i> и гена токсина <i>C.ulcerans</i>	150	0	150
Мазки с пораженных участков кожи	Биологический материал, содержащий ДНК <i>C.diphtheriae</i> и гена токсина <i>C.diphtheriae</i>	50	50	0
	Биологический материал, содержащий ДНК <i>C.diphtheriae</i> и не содержащий ДНК гена токсина <i>C.diphtheriae</i>	50	50	0
	Биологический материал, содержащий ДНК гена токсина <i>C.ulcerans</i>	50	50	0
	Биологический материал, не содержащий ДНК <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена токсина <i>C.diphtheriae</i> и гена токсина <i>C.ulcerans</i>	150	0	150

Материалом исследования являлись образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки и с пораженных участков кожи, отрицательные при исследовании с набором сравнения, а так же модельные образцы клинического материала, контаминированные штаммами микроорганизмов *Corynebacterium diphtheriae* NCTC[®] №10356[™] (tox-), *Corynebacterium diphtheriae* NCTC[®] №10648[™] (tox+) и *Corynebacterium ulcerans* NCTC[®] №7910[™] (tox+) в концентрации 1×10^3 ГЭ/мл, имитирующие биологический материал от больных дифтерией и носителей возбудителя.

**Диагностические характеристики набора реагентов для
диагностики in vitro АмплиСенс® *Corynebacterium*
diphtheriae / tox-genes-FL**

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 95 %) в интервале, %	Диагностическая специфичность ⁴ , (с доверительной вероятностью 95 %) в интервале, %
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	92,9 – 100	97,6 – 100
Мазки с пораженных участков кожи	92,9 – 100	97,6 – 100

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- 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».

³ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁴ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, 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 реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, 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 (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

⁵ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека:

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Реагент для хранения мазков из полости носа и ротоглотки – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (РУ № ФСР 2009/05011) или другие, рекомендованные Изготовителем.
2. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или 0,01 М калий-фосфатный буфер, pH 7,0.
3. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия или аналогичный) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
4. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (например, COPAN, Италия или аналогичный) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
5. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы) в индивидуальной упаковке, стерильный (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный) – зонд для взятия мазков из ротоглотки у детей и взрослых (допустимо использовать для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6. Комплект реагентов для экстракции ДНК/РНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147) или другие, рекомендованные Изготовителем.
7. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

8. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» FRT-100 F:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки

- объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, 100, 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
10. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
12. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
13. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
14. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 4 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие, рекомендованные Изготовителем).
15. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
16. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки

по МУ 1.3.2569-09.

17. Емкость для сброса наконечников.

18. ПО для автоматической обработки результатов, зарегистрированное в установленном порядке.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Все работы по взятию, транспортированию и подготовке проб биологического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой оболочки носо- (берутся через нижний носовой ход) и ротоглотки (берутся с поверхности миндалин, небных дужек, задней стенки ротоглотки);
- мазки с пораженных участков кожи.

Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки

Мазки берут разными зондами со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Мазки со слизистой нижнего носового хода берут сухим стерильным назофарингеальным вельюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3–4 см для детей и 5–6 см для взрослых).

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с

тампоном) помещают до места слома в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков, при этом гибкая часть зонда сворачивается спиралью, далее, прикрывая сверху пробирку крышкой, рукоятку зонда опускают вниз, добиваясь полного отламывания верхней части зонда. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда герметично закрывают и маркируют.

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют.

Допускается хранение исследуемого материала до проведения исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки с пораженных участков кожи

Мазки берут сухими стерильными зондами с тампонами. Мазки с пораженной поверхности кожи собирают после предварительного удаления корочки. После взятия материала часть зонда с тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков (или 0,9 % раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатного буфера, рН 7,0). Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют.

Допускается хранение исследуемого материала до проведения исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Мазки со слизистой носо- и ротоглотки, с пораженных участков кожи не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, мазки с пораженных участков кожи), используемом для исследования.

Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки

Были протестированы образцы мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки без добавления и с добавлением эндогенных (муцин) и экзогенных (водный раствор хлоргексидина биглюконата для местного и наружного применения, 5 %, и раствор Люголя с глицерином, 1 %) потенциально интерферирующих веществ (см. табл. 6).

Тестирование проводили на образцах мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки с добавлением стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК *C.diphtheriae*, ДНК

гена *tox C.diphtheriae* и ДНК гена *tox C. ulcerans*. Конечная концентрация каждого составила 1×10^4 ГЭ/мл.

Мазки с пораженных участков кожи

Были протестированы мазки с пораженных участков кожи от пациентов с аллергическими неинфекционными дерматозами без добавления и с добавлением эндогенных (гемоглобин) и экзогенных (водный раствор хлоргексидина биглюконата для местного и наружного применения, 5 %) потенциально интерферирующих веществ.

Тестирование проводили на мазках с пораженных участков кожи с добавлением стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК *C.diphtheriae*, ДНК гена *tox C.diphtheriae* и ДНК гена *tox C. ulcerans*. Конечная концентрация каждого составила 1×10^4 ГЭ/мл.

Таблица 6

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки	Эндогенные вещества	Муцин	5 %	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5 %	Не обнаружено
		Раствор Люголя с глицерином	0,5 %	Не обнаружено
Мазки с пораженных участков кожи	Эндогенные вещества	Гемоглобин	0,21 г/мл	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Водный раствор хлоргексидина биглюконата	2,5 %	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- проведение амплификации с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп» в соответствии с инструкцией к данному комплекту.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного

образца – **ВКО-FL**.

Объем ВКО-FL – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.

Объем элюции – **50 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 и «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F).

Объем элюции – **100 мкл** (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L).

ВНИМАНИЕ! Для элюции при экстракции ДНК из исследуемых образцов используется буфер, входящий в состав комплекта реагентов «РИБО-преп», а так же буфер для элюции, входящий в состав «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L.

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50)**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>C.diphtheriae</i> / tox genes раскапана под воск	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,01	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-А	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
К+ <i>C.diphtheriae</i> / tox genes	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-FL *C.diphtheriae* / tox genes** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 4). Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-буфера-А**, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с

ПЦР-смесью-FL *C.diphtheriae* / tox genes.

3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ *C.diphtheriae* / tox genes.**
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–.**

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7).

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Таблица 7

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁶ и планшетного⁷ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием данной программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, кроме тестов с обратной транскрипцией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала

⁶ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁷ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме, с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

Таблица 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК токсина <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , ген <i>tox</i>	ДНК <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , ген <i>rpoB</i>	ДНК токсина <i>Corynebacterium ulcerans</i> , ген <i>tox</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>groB</i>)	<i>C.ulcerans</i> (ген <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>, имеющая ген <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>, имеющая ген <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i>. Обнаружена ДНК гена <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>, имеющая ген, сходный с геном <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	НЕ обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>. Обнаружена ДНК гена <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>
<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	ДНК <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i> НЕ обнаружены
Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена <i>tox</i> <i>C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген, сходный с геном <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>tox C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>proB</i>)	<i>C.ulcerans</i> (ген <i>tox C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheria</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i> / низкое содержание <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> , ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>
<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> в низком содержании

* В случае получения **невалидного/сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 10 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)			
		FAM	JOE	ROX	Sy5
OK	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 10) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX, и/или Sy5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F) СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>C.diphtheriae</i> / tox genes	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К+ <i>C.diphtheriae</i> / tox genes	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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.

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется 10 мкл ПЦР-смеси-FL *C.diphtheriae* / tox genes,

5 мкл ПЦР-буфера-В и 0,5 мкл полимеразы (TaqF) (Расчетную таблицу приготовления реакционных смесей см. в приложении 1). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 7) плюс запас на несколько реакций.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с **ПЦР-смесью-FL *C.diphtheriae* / tox genes**. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL *C.diphtheriae* / tox genes**, **ПЦР-буфера-В** и **полимеразы (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ *C.diphtheriae* / tox genes**.
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 11).

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Таблица 11

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁸ и
планшетного⁹ типа**

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов

⁸ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

⁹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме, с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

Таблица 12

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК токсина <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , ген <i>tox</i>	ДНК <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , ген <i>rpoB</i>	ДНК токсина <i>Corynebacterium ulcerans</i> , ген <i>tox</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (*Ct*) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 13

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C. diphtheriae</i> (ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C. diphtheriae</i> (ген <i>rpoB</i>)	<i>C. ulcerans</i> (ген <i>tox</i> <i>C. ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C. diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C. diphtheriae</i>, имеющая ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C. diphtheriae</i>, имеющая ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>. Обнаружена ДНК гена <i>tox</i> <i>C. ulcerans</i>

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>tox C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>proB</i>)	<i>C.ulcerans</i> (ген <i>tox C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющая ген, сходный с геном <i>tox C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	НЕ обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>. Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i>
<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	ДНК <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> , ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> НЕ обнаружены
Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген, сходный с геном <i>tox C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheria</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i> / низкое содержание <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> , ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>tox C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>proB</i>)	<i>C.ulcerans</i> (ген <i>tox C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
				повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>
<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> в низком содержании

* В случае получения **невалидного/сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 14 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			
		FAM	JOE	ROX	Sy5
OK	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 14) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX, и/или Sy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Sy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового

цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА 3 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участка ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>C.diphtheriae</i> / tox genes-Lyo	Порошок белого цвета	–	96 пробирок объемом 0,2 мл
K+ <i>C.diphtheriae</i> / tox genes	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирок
Буфер для элюции А	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с готовой лиофилизированной реакционной **ПЦР-смесью *C.diphtheriae* / tox genes-Lyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 3).
2. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых

образцов.

3. Поставить контрольные реакции:

а) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К+ *C.diphtheriae* / tox genes**.

в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К–**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 15).

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Таблица 15

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹⁰ и планшетного¹¹ типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и

¹⁰ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

¹¹ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

Таблица 16

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК токсина <i>Corynebacterium diphtheria</i> , ген <i>tox</i>	ДНК <i>Corynebacterium diphtheria</i> , ген <i>rpoB</i>	ДНК токсина <i>Corynebacterium ulcerans</i> , ген <i>tox</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем

уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 17

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>proB</i>)	<i>C.ulcerans</i> (ген <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>, имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>, имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i>. Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>, имеющая ген, сходный с геном <i>tox C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	НЕ обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>. Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i>
<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	ДНК <i>C.diphtheriae</i> , ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> , ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> НЕ обнаружены
Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>tox C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>groB</i>)	<i>C.ulcerans</i> (ген <i>tox C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
Определено или отсутствует	Отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген, сходный с геном <i>tox C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheria</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i> / низкое содержание <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
<u>Определено</u> или отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> , ДНК <i>C.diphtheriae</i> и низкое содержание ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> не больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК гена <i>tox C.ulcerans</i> и низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.pseudotuberculosis</i> , имеющая ген <i>tox C.diphtheriae</i>
Определено или отсутствует	<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружено низкое содержание ДНК <i>C.diphtheriae</i> , имеющей ген <i>tox C.diphtheriae</i> . Рекомендуется повторное взятие материала

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5	
ВКО	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>tox</i> <i>C. diphtheriae</i>)	<i>C.diphtheriae</i> (ген <i>proB</i>)	<i>C.ulcerans</i> (ген <i>tox</i> <i>C.ulcerans</i>)	
Приборы роторного и планшетного типа				
<u>Определено</u> не больше граничного	Отсутствует	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i>
<u>Определено</u> не больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	<u>Определено</u> больше граничного	Отсутствует или определено больше граничного	Сомнительный* При повторении считать, что обнаружена ДНК <i>C.diphtheriae</i> и ДНК гена <i>tox C.diphtheriae</i> в низком содержании

* В случае получения **невалидного/сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции.

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 18 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 18

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
OK	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 18) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию

- и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX, и/или Cy5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
 3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE, и/или ROX, и/или Cy5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
 4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 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 в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-FL *C.diphtheriae* / tox genes хранить в защищенном от света месте.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-В, полимеразы (TaqF) и ПЦР-смеси-FL *C.diphtheriae* / tox genes. ПЦР-буфер-В, полимеразу (TaqF) и ПЦР-смесь-FL *C.diphtheriae* / tox genes хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *C.diphtheriae* / tox genes хранить в защищенном от света месте.

Форма 3. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. Лиофилизированные реагенты (ПЦР-смесь *C.diphtheriae* / tox genes-Lyo) хранить в пакетах с влагопоглотителем. ПЦР-смесь *C.diphtheriae* / tox genes-Lyo хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru¹².

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ
«Поликлиника №1»
Управления делами Президента
Российской Федерации



Е.В. Ржевская

¹² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер по каталогу		Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Код партии		Использовать до
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изменения		Не допускать воздействия солнечного света
	Температурный диапазон		Дата изготовления
	Изготовитель		Беречь от влаги

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Расчетная таблица приготовления реакционных смесей для проведения амплификации для комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

		Объем реактивов на указанное количество реакций		
Объем реагента на одну реакцию, мкл		10,0	5,0	0,5
Количество исследуемых образцов	Количество реакций ¹³	ПЦР-смесь-FL	ПЦР-буфер-В	Полимераза (TaqF)
2	6	60	30	3
4	8	80	40	4
6	10	100	50	5
8	12	120	60	6
10	14	140	70	7
12	16	160	80	8
14	18	180	90	9
16	20	200	100	10
18	22	220	110	11
20	24	240	120	12
22	26	260	130	13
24	28	280	140	14
26	30	300	150	15
28	32	320	160	16
30	34	340	170	17
32	36	360	180	18
68	72	720	360	36
92	96	960	480	48

¹³ Количество реакций = количество исследуемых образцов + контроли этапа экстракции ДНК (ОК) и 2 контроля этапа ПЦР (К+, К-) + запас на один образец (N+1+2+1, где N- количество исследуемых образцов).