

УТВЕРЖДЕНА  
Приказом Росздравнадзора  
от 12.10.12 № 1890-Пп/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  
«15» июня 2012 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila  
pneumoniae* в биологическом материале методом  
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-  
флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс<sup>®</sup> *Mycoplasma pneumoniae* /  
*Chlamydophila pneumoniae*-FL»**

**АмплиСенс<sup>®</sup>**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ .....	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК.....	13
ФОРМАТ FEP .....	15
СОСТАВ.....	15
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ .....	16
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ .....	17
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ.....	17
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации .....	17
Б. Проведение амплификации .....	18
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» .....	19
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	20
ФОРМАТ FRT .....	23
СОСТАВ.....	23
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ .....	25
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ .....	26
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	26
А. Подготовка пробирок для амплификации .....	26
А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT .....	26
А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F .....	27
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	28
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	30
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ .....	33
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб» .....	34
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» .....	36
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из проб при использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG .....	38
Вариант 1. Экстракция ДНК с лизисом образца вне прибора.....	38
Вариант 2. Экстракция ДНК с лизисом образца в приборе.....	39
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ .....	41

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

В–	- Отрицательный контроль экстракции (выделения) ДНК
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- Положительный контроль ПЦР
К–	- Отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- Отрицательный контрольный образец
ПКО	- Положительный контрольный образец
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- Флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- Флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*-FL» предназначен для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные из образцов следующего материала: мокроты (либо аспиратов из трахеи), промывных вод бронхов, бронхоальвеолярного лаважа, мазков со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки, секционного материала.

Набор также может использоваться при изучении роли *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в патогенезе неинфекционных хронических заболеваний, например, сердечно - сосудистой системы путем обнаружения ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в цельной крови при использовании для экстракции ДНК комплекта реагентов «РИБО-сорб».

**ВНИМАНИЕ!** Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания<sup>1</sup>.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией—включает в себя

<sup>1</sup> В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС

два этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала, амплификацию участков генов «*putative lipoprotein*» *Mycoplasma pneumoniae* и «ompA» *Chlamydophila pneumoniae* в присутствии флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT), либо после ее завершения (формат FEP). В анализе используется принцип эндогенного внутреннего контроля - амплификация участка гена протромбина человека, что позволяет контролировать присутствие в образце клеток и ДНК человека в достаточном количестве. Таким образом, эндогенный внутренний контроль позволяет не только контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и проведение ПЦР), но и оценивать адекватность взятия материала и его хранения.

## **ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ**

**Набор реагентов выпускается в 2 форматах.**

### **Формат FEP**

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл);

**Форма 2** включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл);

**Форма 3** включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл);

**Форма 4** включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл);

**Форма 5** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл);

**Форма 6** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл);

**Форма 7** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала методом преципитации и амплификацию ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке»

Формат FEP Форма 5: [REF](#) B42-50-Mod-R0,5-FEP; [REF](#) H-1765-2-5; Форма 6: [REF](#) B42-50-Mod-R0,2-FEP; [REF](#) H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: [REF](#) R-B42-4x-Mod; [REF](#) H-1765-1-2; Форма 6: [REF](#) H-

Формы комплектации 3, 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала методом сорбции на силикагеле и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке»

Формы комплектации 5, 6 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК/РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 7 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 7 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

### **Формат FRT**

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

**Форма 2** включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

**Форма 3** включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

**Форма 4** включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

**Форма 5** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора)

**Форма 6** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

**Форма 7** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала методом преципитации и

Формат FEP Форма 5: [REF](#) B42-50-Mod-R0,5-FEP; [REF](#) H-1765-2-5; Форма 6: [REF](#) B42-50-Mod-R0,2-FEP; [REF](#) H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: [REF](#) R-B42-4x-Mod; [REF](#) H-1765-1-2; Форма 6: [REF](#) H-

амплификацию ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 3, 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала методом сорбции на силикагеле и амплификацию ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 5, 6 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-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 7 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 7 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Возбудитель	Объем материала, мкл	Комплект для экстракции ДНК/РНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл <sup>2</sup>
Слизистая нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки и мокрота, обработанные муколизинном	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	100	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FEP	1x10 <sup>3</sup>
			«РИБО-преп»		5x10 <sup>2</sup>
			NucliSENS easyMAG		5x10 <sup>2</sup>
			«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT, вариант FRT-100 F	1x10 <sup>3</sup>
			«РИБО-преп»		5x10 <sup>2</sup>
			NucliSENS easyMAG		5x10 <sup>2</sup>

### Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных возбудителей. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Streptococcus* spp., *Moraxella catarrhalis*,

<sup>2</sup> Чувствительность выражается в геномных эквивалентах (ГЭ) возбудителя в 1 мл пробы.

Формат FEP Форма 5: [REF] B42-50-Mod-R0,5-FEP; [REF] H-1765-2-5; Форма 6: [REF] B42-50-Mod-R0,2-FEP; [REF] H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: [REF] R-B42-4x-Mod; [REF] H-1765-1-2; Форма 6: [REF] H-

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacteria tuberculosis* 27294 105, *Neisseria flava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *E. coli* ATCC, NCTC, *Enterococcus faecalis*, *Legionella pneumophila*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, а также геномной ДНК человека. Показано отсутствие активности компонентов набора в отношении родственных микроорганизмов: *Chlamydophila arginini*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia suis*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psittaci*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma mycoides* (подвид *capri*), *Mycoplasma hyorinis*, *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma faucium*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma sinoviae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*.

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в

соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду 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.
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой



и обратиться за медицинской помощью.

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

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

### **Взятие исследуемого материала**

1. Транспортная среда – «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ТУ 9398-083-01897593-2009).
2. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (516CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
3. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (503CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
4. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный (300202, Deltalab, Испания) – зонд для взятия мазков из ротоглотки у детей и взрослых.
5. Муколизин (ТУ 9398-159-01897593-2011) - реагент для проведения предварительной подготовки мокроты и аспиратов вязкой консистенции.
6. Стерильный физиологический раствор или фосфатный буферный раствор – для предварительной подготовки секционного материала.
7. Фарфоровые ступки с пестиками для гомогенизации секционного материала.
8. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс г.

### **ЗОНА 1 Экстракция ДНК из исследуемого материала**

1. Комплект реагентов для выделения – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора - при работе с формами комплектации 5 и 6 (вариант FEP и вариант FRT).
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.
3. Автоматическая станция для выделения РНК/ДНК

Формат FEP Форма 5: **REF** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **REF** H-1765-2-5; Форма 6: **REF** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **REF** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **REF** R-B42-4x-Mod; **REF** H-1765-1-2; Форма 6: **REF** H-

(например NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

4. 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 использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

## **ЗОНА 2. Проведение ПЦР и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации.**

1. Бокс бактериальной воздушной среды ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
2. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия)
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и 200 мкл в штативах (например, Ахуген, США).
5. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например «ИнтерЛабСервис», Россия)
6. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
7. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
8. Емкость для сброса наконечников.

### При работе с «ПЦР-комплект» вариант FEP:

1. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США)).
2. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия), и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

## При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT:

1. 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 и iCycler iQ (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
2. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-100 F:
  - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой - при использовании прибора планшетного типа;
  - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

## **ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служат: мазки со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки, мокрота (либо аспираты из трахеи), бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов (ПВБ), секционный материал (фрагменты пораженной части легких), цельная кровь.

### Взятие мазков со слизистой нижнего носового хода

Мазки берут сухим стерильным назофарингеальным вельюрампом 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

Формат FEP Форма 5: **REF** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **REF** H-1765-2-5; Форма 6: **REF** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **REF** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **REF** R-B42-4x-Mod; **REF** H-1765-1-2; Форма 6: **REF** H-

слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

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. Конец зонда отламывают с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают и маркируют.

#### Взятие мазков из ротоглотки

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

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким 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 и маркируют.

**ВНИМАНИЕ!** При взятии мазков рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого сначала берут мазки 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 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Допускается хранение клинического материала до проведения исследования в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С.

#### Мокрота или аспират из трахеи

Мокроту собирают в стерильные герметичные одноразовые пластиковые контейнеры, после предварительного полоскания полости рта водой. Аспираты из трахеи получают традиционным способом и помещают в стерильные

герметичные одноразовые пластиковые контейнеры.

Бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ) или промывные воды бронхов (ПВБ) собирают в одноразовые плотно завинчивающиеся емкости из полипропилена (во избежание адгезии клеток на внутренней поверхности емкости) объемом не менее 5 мл.

Допускается хранение вышеперечисленного материала до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С.

Секционный материал помещают в стерильные одноразовые контейнеры и замораживают сразу после взятия либо исследуют в течение 1 ч. Дальнейшее хранение материала возможно в течение года при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Цельную кровь собирают в пробирки типа Vacuette® с раствором или напылением ЭДТА. Закрытую пробирку с материалом несколько раз переворачивают, чтобы перемешать консервант. Для анализа используют цельную кровь, собранную у пациента утром натощак, без предварительной подготовки. Допускается хранение в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С.

**ВНИМАНИЕ!** Данный материал не используется для диагностики ОРЗ. Для экстракции ДНК рекомендуется использовать только комплект реагентов «РИБО-сорб».

## **ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК**

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл, наконечников с фильтрами и др. материалов в соответствии с документами, перечисленными в разделе «Меры предосторожности».

**Мазки из респираторного тракта.** Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Для экстракции ДНК отбирают 100 мкл образца.

**Мокрота или аспират из трахеи.** Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке с целью снижения вязкости,

работа выполняется по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Подготовленную мокроту (100 мкл) используют для экстракции ДНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

**Промывные воды бронхов или бронхо-альвеолярный лаваж.** Образец перемешивают переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл образца и переносят в пробирку объемом 1,5 мл для проведения центрифугирования при 10 тыс об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Полученную суспензию (100 мкл) используют для экстракции ДНК. При необходимости повторного проведения анализа оставшийся материал замораживают.

**Секционный материал** гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку на 1,5 мл и центрифугируют при 10 тыс об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (100 мкл) используют для экстракции ДНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток суспензии замораживают.

**ФОРМАТ FEP  
СОСТАВ**

**Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50** (ТУ 9398-004-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>Лизирующий раствор</b>	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>3</sup>	22,5	1 флакон
<b>Раствор для отмывки 1</b>	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>3</sup>	20	1 флакон
<b>Раствор для отмывки 3</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
<b>Раствор для отмывки 4</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
<b>Сорбент</b>	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
<b>РНК-буфер</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3 и 4.

**Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50** (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
<b>Раствор для лизиса</b>	Прозрачная жидкость голубого цвета <sup>4</sup>	15	1 флакон
<b>Раствор для преципитации</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
<b>Раствор для отмывки 3</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
<b>Раствор для отмывки 4</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
<b>РНК-буфер</b>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1 и 2.

<sup>3</sup> При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

<sup>4</sup> При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

## ФОРМАТ FEP

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP** – комплект реагентов для амплификации и идентификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae* гибридационнo-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок вместимостью 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> / <i>Prothrombin</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
TE-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов
- Амплификация
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- 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 ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационнo-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydomphila pneumoniae*-FL»,

Формат FEP Форма 5: **REF** B42-50-Mod-R0,5-FEP; **REF** H-1765-2-5; Форма 6: **REF** B42-50-Mod-R0,2-FEP; **REF** H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: **REF** R-B42-4x-Mod; **REF** H-1765-1-2; Форма 6: **REF** H-



разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора

## **ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп», автоматической станцией **NucliSENS easyMAG** (производства bioMérieux, Франция) и набором реактивов и расходных материалов NucliSENS easyMAG описан в приложениях 1, 2, 3.

## **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ**

**ВНИМАНИЕ!** На этапе амплификации для ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydomphila pneumoniae* используются 2 пробирки «Фон», положительный контроль амплификации и отрицательный контроль амплификации, предназначенный для контроля чистоты реагентов и аккуратности работы оператора при каждой постановке эксперимента. Кроме того, на этапе амплификации исследуется отрицательный контроль этапа экстракции ДНК (В–).

**Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.**

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

**А. Подготовка пробирок для проведения амплификации**

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydomphila pneumoniae* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. В пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydomphila pneumoniae* на поверхность застывшего воска внести по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться

- с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*.
3. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
  4. Приготовить 2 образца «Фон». Для этого в две пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae* на поверхность застывшего воска внести по 17 мкл ПЦР-смеси-Фон, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР.
  5. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
  6. Поставить контрольные реакции:
    - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ТЕ-буфера.
    - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae* / *Prothrombin*.
    - в) отрицательный контроль экстракции (В-) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из образца ОКО.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

## **Б. Проведение амплификации**

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования / амплификации (см. табл. 1).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

**Программа амплификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae***

Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):						
«Терцик» («ДНК-технология»)				GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research), MaxyGene (Axygen)		
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42
	63 °С	20 с		63 °С	25 с	
	72 °С	20 с		72 °С	25 с	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	4 °С	хранение		4 °С	хранение	

**Примечание** – Программы термоциклирования для других моделей амплификаторов описаны в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

**ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»**

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по трем каналам для флуорофоров, указанным в табл. 2.

**Соответствие мишеней и каналов детекции**

Наименование ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	Детекция по каналу для флуорофора		
	FAM	JOE	ROX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ДНК человека	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>

**ВНИМАНИЕ!** До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к набору реагентов, а также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydomphila pneumoniae*-FL».

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора в соответствии с табл. 2. Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК возбудителя **обнаружена**, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу для флуорофора выше установленного порогового значения положительного результата, указанного во вкладыше к набору.
- ДНК возбудителя **не обнаружена**, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу ниже установленного порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу для флуорофора JOE (ВКО – ДНК человека) выше установленного порогового значения.

- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по соответствующему каналу для детекции данной мишени (см. табл. 2) ниже установленного порогового значения и сигнал по каналу для флуорофора JOE ниже установленного порогового значения. Для образцов «К–» и «В–» отрицательный результат по всем каналам является нормой.
- Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы сигнал по каналу для детекции ДНК возбудителя выше установленного порогового значения отрицательного результата, но ниже порогового значения положительного результата (сигнал находится между пороговыми значениями), а сигнал по каналу для флуорофора JOE (ВКО – ДНК человека) выше установленного порогового значения. Если для пробы получен **сомнительный** результат, требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции ДНК. При повторении **сомнительного** результата рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

**Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 3.**

Таблица 3

**Результаты анализа контрольных образцов**

Конт- роль	Контролиру- емый этап ПЦР- исследования	Сигнал по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
		Детекция <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Детекция ДНК человека	Детекция <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
В–	Экстракция НК	Ниже порогового значения* отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата
К–	ПЦР	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата
К+	ПЦР	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения	Выше порогового значения положительного результата

\* - Пороговые значения указаны во вкладыше к набору реагентов

### **ВНИМАНИЕ!**

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение уровня флуоресценции ниже порогового значения положительного результата по соответствующему каналу детекции, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных по данному каналу клинических образцов и положительного контроля ПЦР.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу детекции какой-либо мишени выше граничного значения отрицательного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена данная мишень, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить последствия возможной контаминации.

## ФОРМАТ FRT

### СОСТАВ

**Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 или вариант 100** – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	Описание	Вариант 50		Вариант 100	
		Объем, мл	Кол-во	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>5</sup>	22,5	1 флакон	45	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость <sup>3</sup>	20	1 флакон	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон	100	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон	40	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка	1,25	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок	0,5	10 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

**Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 или вариант 100** – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	Описание	Вариант 50		Вариант 100	
		Объем, мл	Кол-во	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета <sup>6</sup>	15	1 флакон	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон	50	1 флакон

<sup>5</sup> При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

<sup>6</sup> При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

## ФОРМАТ FRT

Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT** – комплект реагентов для амплификации и идентификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydomphila pneumoniae* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> / <i>Prothrombin</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка



## ФОРМАТ FRT

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F –** комплект реагентов для амплификации и идентификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT (F) <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydophila pneumoniae</i> / <i>Prothrombin</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Формат FEP Форма 5: [REF] B42-50-Mod-R0,5-FEP; [REF] H-1765-2-5; Форма 6: [REF] B42-50-Mod-R0,2-FEP; [REF] H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: [REF] R-B42-4x-Mod; [REF] H-1765-1-2; Форма 6: [REF] H-

## **ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп», автоматической станцией **NucliSENS easyMAG** (производства bioMérieux, Франция) и набором реактивов и расходных материалов **NucliSENS easyMAG** описан в приложениях 1, 2, 3.

## **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**

**ВНИМАНИЕ!** На этапе амплификации при каждой постановке реакции используются положительный контроль амплификации и отрицательный контроль амплификации, предназначенный для контроля чистоты реагентов и аккуратности работы оператора. Кроме того, на этапе амплификации исследуется отрицательный контроль этапа экстракции ДНК (В–).

**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 пробирок для амплификации**

#### **А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT**

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

- 1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydomphila pneumoniae* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.**
- 2. На поверхность воска внести по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP/FRT *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydomphila pneumoniae*.**

3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
  - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
  - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae* /Prothrombin**.
  - в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из образца **В–**.
5. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки кратким центрифугированием (1–2 с) с помощью центрифуги/вортекса (для приборов планшетного типа).

## **A2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплектов реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F**

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

1. Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FRT (F) *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae***, **ПЦР-смесью-2-FRT** и полимеразой (TaqF). Перемешать содержимое пробирок с реагентами **ПЦР-смесь-1-FRT (F) *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae***, **ПЦР-смесь-2-FRT** и полимеразы (TaqF) и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций (включая 2 контроля ПЦР) смешать в отдельной пробирке **10\*(N+1) мкл ПЦР-смесью-1-FRT (F) *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae***, **5\*(N+1) мкл ПЦР-смеси-2-FRT** и **0,5\*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**.
4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.

6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
  - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
  - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydomphila pneumoniae*/ Prothrombin**.
8. **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из образца **В–**. Осадить реакционную смесь в нижнюю часть пробирки кратким центрифугированием (1–2 с) с помощью центрифуги/вортекса (для приборов планшетного типа).

#### **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 (см. табл. 4.).

Таблица 4.

**Программа амплификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* вариант FRT**

	Приборы роторного типа <sup>7</sup>			Приборы планшетного типа <sup>8</sup>		
Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	<b>5 мин</b> (для формата FRT) <b>или</b> <b>15 мин</b> (для формата FRT-100 F)	1	95	<b>5 мин</b> (для формата FRT) <b>или</b> <b>15 мин</b> (для формата FRT-100 F)	1
2	95	10 с	10	95	10 с	10
	60	20 с		60	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	35	95	10 с	35
	60	20 с		60	25 с	
		детекция флуоресц. сигнала			детекция флуоресц. сигнала	
72	10 с	72	25 с			

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX.

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.

**Примечание** – Программа термоциклирования для конкретной модели амплификатора описана в методических рекомендациях «Методические Рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс<sup>®</sup> *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*-FL».

<sup>7</sup> Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

<sup>8</sup> Например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), CFX96 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

Формат FEP Форма 5: [REF] B42-50-Mod-R0,5-FEP; [REF] H-1765-2-5; Форма 6: [REF] B42-50-Mod-R0,2-FEP; [REF] H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: [REF] R-B42-4x-Mod; [REF] H-1765-1-2; Форма 6: [REF] H-

## АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов в соответствии с табл. 5 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.

Таблица 5

### Соответствие мишеней и каналов детекции

Наименование ПЦР-смеси-1	Детекция по каналу для флуорофора		
	FAM	JOE	ROX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ДНК человека	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
ПЦР-смесь-1-FRT (F) <i>Mycoplasma pneumoniae</i> / <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ДНК человека	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК возбудителя **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу (см. табл. 5) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное во вкладыше к набору реагентов граничное значение. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК возбудителя **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по соответствующему каналу (см. табл. 5) отсутствует значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), или превышает указанное во вкладыше граничное значение, а в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** (ВКО –

ДНК человека) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение.

- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналам для флуорофоров (**FAM** или **ROX**) или превышает указанное граничное значение (см. табл. 6), и по каналу для флуорофора для ВКО (**JOE**) значение *Ct* также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК. При повторении результата рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше к набору реагентов и в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Методические Рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*-FL».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 6).

Таблица 6

**Результаты анализа контрольных образцов**

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР- исследования	Сигнал по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
		Детекция <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Детекция ДНК человека	Детекция <i>Chlamydophila pneumoniae</i>
В–	Экстракция РНК	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
К–	ПЦР	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
К+	ПЦР	<u>Меньше порогового значения</u>	<u>Меньше порогового значения</u>	<u>Меньше порогового значения</u>

**ВНИМАНИЕ!**

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу детекции какого-либо гена-мишени отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех отрицательных по данному каналу клинических образцов и положительного контроля ПЦР.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по каналу детекции какой-либо мишени меньше граничного значения, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена данная мишень, начиная с этапа экстракции, чтобы исключить последствия возможной контаминации.



## СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

**Срок годности.** Для всех форм комплектации варианта FEP – 9 мес. Для форм комплектации 1, 2, 5 (формат FRT) – 9 мес. Для форм комплектации 3, 4, 6 (формат FRT-100 F) – 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. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydomphila pneumoniae*-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)<sup>9</sup>.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»

Управления делами Президента Российской Федерации



Е.Н. Родионова

Е.Л. Никонов

<sup>9</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://www.amplisens.ru).

### ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб»

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку по **450 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором** внести по **100 мкл исследуемых проб**, используя наконечники с фильтрами. Перемешать пипетированием. Инкубировать при комнатной температуре от 3 до 5 мин.
4. В пробирку отрицательного контроля (В–) выделения внести **100 мкл ОКО**.
5. Плотные закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), центрифугировать при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в другие пробирки.
6. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
7. Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость,

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

---

используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

9. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
10. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя п. 9.
11. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
12. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
13. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя наконечники с фильтрами, свободные от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 60 °С на 2-3 мин. Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12–13 тыс об/мин) в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке амплификации.

Отбирать раствор ДНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, более длительно при температуре не выше минус 68 °С.

### ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Экстракция ДНК из проб при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

#### Порядок работы:

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтрами. В пробирку отрицательного контроля (В–) выделения внести **100 мкл ОКО**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 10 мкл** для каждой пробы.

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

---

11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Центрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Центрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °C, более длительно при температуре не выше минус 68 °C.

### ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Экстракция ДНК из проб при использовании автоматической станции NucliSENS easyMAG

#### Вариант 1. Экстракция ДНК с лизисом образца вне прибора

Данный метод выделения позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки (мокрота, аспираты).

#### Порядок работы:

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для выделения ДНК (установить *Other*), объем образца (*volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Eluate*) – 25 ml, тип образца (*Type*) – Lysed, очередность выделения ДНК в образцах (*priority*) – normal.
3. Создать новый протокол выделения ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: *On-board Lysis Buffer Dispensing - No, On-board Lysis Incubation - No*.
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для выделения ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль выделения). Добавить в пробирки по **550 мкл буфера для лизиса NucliSens**.

**ВНИМАНИЕ!** При работе с материалом, содержащем сгустки, лизис рекомендуется проводить в пробирках объемом 1,5 мл. После окончания инкубации (см. п. 8) следует провести центрифугирование пробирок при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в специализированные пробирки, предназначенные для выделения ДНК в приборе NucliSENS easyMAG.

6. В пробирки с **раствором для лизиса** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с

Формат FEP Форма 5: [REF](#) B42-50-Mod-R0,5-FEP; [REF](#) H-1765-2-5; Форма 6: [REF](#) B42-50-Mod-R0,2-FEP; [REF](#) H-1766-2-2; Формат FRT Форма 5: [REF](#) R-B42-4x-Mod; [REF](#) H-1765-1-2; Форма 6: [REF](#) H-

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

---

- аэрозольным барьером и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.)
7. В пробирку отрицательного контроля выделения (В–) выделения внести **100 мкл ОКО**.
  8. Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуре.
  9. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
  10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения ДНК с лизисом образцов вне прибора (*off board*).
  11. После окончания выделения ДНК, извлечь пробирки из прибора.

При необходимости хранения очищенные ДНК следует перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после экстракции. Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, более длительно при температуре не выше минус 68 °С.

### Вариант 2. Экстракция ДНК с лизисом образца в приборе.

#### Порядок работы:

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к выделению ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для выделения ДНК (установить *Other*), объем образца (*volume*) – 0,1 ml, объем элюции (*Eluate*) – **25 mkl**, тип образца (*Type*) – Primary, очередность выделения ДНК в образцах (*priority*) - normal.
3. Создать новый протокол выделения ДНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: *On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes*,

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

---

*On-board Lysis Incubation – Yes.*

4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок, предназначенных для выделения РНК/ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль выделения).
6. В пробирки внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку отрицательного контроля выделения (В–) внести **100 мкл ОКО**.
8. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения ДНК с лизисом образцов в приборе (*on board*).
9. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении *Instrument State – Idle*.
10. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Открыть крышку прибора и в каждую пробирку внести отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
11. Закрыть крышку прибора и продолжить программу выделения ДНК.
12. После окончания выделения ДНК, извлечь пробирки из прибора.

При необходимости хранения очищенные ДНК следует перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после экстракции. Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, более длительно при температуре не выше минус 68 °С.



## СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации



Код партии



Максимальное число тестов



Изделие для *in vitro* диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель