

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора Федерального  
бюджетного учреждения науки  
«Центральный научно-  
исследовательский институт  
эпидемиологии» Федеральной  
службы по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия  
человека



А.В. Горелов

« 18 » \_\_\_\_\_ 20 19 г.

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

**АмплиСенс® NmABCW-FL**

**АмплиСенс®**



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

IVD

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ .....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА .....	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ .....	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ .....	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ .....	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	11
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .....	12
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	12
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F) .....	13
СОСТАВ .....	13
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .....	13
А. Подготовка проб для амплификации .....	13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ...	14
В. Анализ и интерпретация результатов .....	15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	19
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ .....	20
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	21

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО <i>ctrA</i>	- эндогенный внутренний контрольный образец (участок гена <i>ctrA N.meningitidis</i> )
ГФМИ	- генерализованные формы менингококковой инфекции
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
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»
<i>N.meningitidis</i>	- <i>Neisseria meningitidis</i>

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс® NmABCW-FL предназначен для качественного определения и дифференциации серогрупп А, В, С и W *Neisseria meningitidis* в биологическом материале (спинномозговая жидкость (ликвор), кровь) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения ДНК *N.meningitidis* в исследуемых образцах либо с помощью набора реагентов «АмплиСенс® *N.meningitidis* / *H.Influenzae* / *S.pneumoniae*-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (РУ № ФСР 2011/12380), либо другим зарегистрированным в РФ набором реагентов или методом.

**ВНИМАНИЕ!** Набор реагентов предназначен только для исследования биологического материала, содержащего ДНК *N.meningitidis*, вызвавших генерализованные формы менингококковой инфекции (ГФМИ).

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.

## **Показания и противопоказания к применению набора реагентов**

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с ГФМИ.

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 клинико-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 одновременной амплификации участков ДНК *N.meningitidis* серогрупп А, В, С и W и эндогенного внутреннего контроля с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

В качестве эндогенного внутреннего контроля используется ДНК гена *ctrA* (ВКО *ctrA*) и позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца. ВКО *ctrA*, являясь участком генома *N.meningitidis*, должен всегда присутствовать в образце, используемом для определения серогруппы возбудителя ГФМИ.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-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».

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится 5 реакций – амплификация ДНК серогрупп-специфичной мишени *N.meningitidis* (А, В, С или W), а также амплификация ВКО *ctrA*. Результаты амплификации ДНК *N.meningitidis* серогрупп А, В, С и W и ДНК ВКО *ctrA* регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	<i>N.meningitidis</i> серогруппа А	<i>N.meningitidis</i> серогруппа В	<i>N.meningitidis</i> серогруппа С	<i>N.meningitidis</i> серогруппа W	ВКО <i>ctrA</i> ( <i>N.meningitidis</i> )
Область амплификации	<i>sacA</i>	<i>siaD</i>	<i>synE</i>	<i>siaD</i>	<i>ctrA</i>

## ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

**Форма 1:** «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

**Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)**

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
Проба ДНК, полученная путем экстракции из биологического материала	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1x10 <sup>4</sup>

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и

хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

### **Аналитическая специфичность**

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК *N.meningitidis* серогрупп А, В, С и W. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* серотипа *b*, *Streptococcus agalactiae* и *Listeria monocytogenes*, а также штаммов *N.meningitidis* серогрупп А, В, С, Е, W, X, Y и Z в концентрации не менее  $1 \times 10^6$  ГЭ/мл.

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

Оценка аналитической специфичности набора реагентов показала отсутствие перекрестных реакций между серогруппами А, В, С и W *N.meningitidis* при использовании ДНК, выделенной из штаммов соответствующих серотипов.

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

### **Повторяемость, воспроизводимость**

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных образцов. Положительные образцы представляли собой образцы ДНК, выделенные из крови и спинномозговой жидкости, в которых обнаружена ДНК *Neisseria meningitidis*. Было проанализировано по 1 образцу ДНК каждой серогруппы в трех повторах при одинаковых и различных контролируемых переменных. В качестве отрицательных образцов были использованы образцы ДНК, выделенные из крови и спинномозговой жидкости, в которых не обнаружена ДНК *Neisseria meningitidis*. Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	12	100	24	100
Отрицательные	6	100	12	100

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

При исследовании диагностической чувствительности и специфичности было протестировано 154 образца ДНК. Содержание ДНК *N.meningitidis* серогрупп А, В, С, W в образцах подтверждено методом секвенирования по Сэнгеру. Полученные результаты указаны в таблице 4.

Таблица 4

### Диагностические характеристики набора реагентов АмплиСенс® NmABCW-FL

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %)
Проба ДНК, полученная путем экстракции из крови	100% (78,20% - 100%)	100% (87,23% - 100%)
Проба ДНК, полученная путем экстракции из СМЖ	100% (78,20% - 100%)	100% (87,23% - 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».
- 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, упаковку<sup>1</sup>, 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)

---

<sup>1</sup> Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.



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»).
- 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**

### **Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки:
  - 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.
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
3. Штативы для пробирок объемом 1,5, 0,2 или 0,1 мл

- (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
  5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
  6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
  7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 5 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).
  8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
  9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
  10. Емкость для сброса наконечников.

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

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные ранее на этапе экстракции из исследуемого материала, в которых обнаружена ДНК *N.meningitidis* любым зарегистрированным в РФ набором реагентов или методом.

Допускается хранение образцов ДНК *N.meningitidis* до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 1 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 1 недели;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

## **ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА**

В ходе анализа рисков были определены следующие особенности состава набора реагентов и конфигурации анализа, которые позволяют исключить влияние потенциально интерферирующих веществ на метод полимеразной цепной реакции:

- использование в качестве исследуемых образцов проб ДНК, полученных ранее на этапе экстракции из исследуемого материала, в которых уже была обнаружена ДНК *N.meningitidis*;
- использование специфичных праймеров и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, комплементарных участкам выявляемых ДНК-мишеней;
- использование ДНК гена *ctrA N.meningitidis* в качестве эндогенного внутреннего контроля (ВКО *ctrA*).

Критерием отсутствия влияния потенциально интерферирующих веществ является наличие сигнала ДНК гена *ctrA* по окончании реакции амплификации. В случае отсутствия сигнала ДНК гена *ctrA* и ДНК *N.meningitidis* серогрупп А, В, С и W, результат анализа считается невалидным.

В виду указанных особенностей состава набора реагентов и конфигурации анализа, изучение интерферирующих свойств отдельных компонентов биологического образца не требуется.

## **ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

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

**«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F** – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *N.meningitidis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL NmABCW	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
К+ NmABCW	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

## 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 NmABCW**, **5 мкл ПЦР-буфера-С** и **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на

общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 7) плюс запас на одну реакцию.

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

2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-FL NtABCW, ПЦР-буфером-С, полимеразой (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL NtABCW, ПЦР-буфера-С 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.

**ВНИМАНИЕ!** При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ NtABCW**.
- б) **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. 5).

Таблица 5

### Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного<sup>2</sup> и планшетного<sup>3</sup> типа

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	56	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5, Cy5.5	
	72	10 с	–	

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

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 пяти каналам:

Таблица 6

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	<i>N.meningitidis</i> серогруппа А	<i>N.meningitidis</i> серогруппа В	<i>N.meningitidis</i> серогруппа С	<i>N.meningitidis</i> серогруппа W	ВКО <i>ctrA</i> ( <i>N.meningitidis</i> )

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

<sup>2</sup> Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

<sup>3</sup> Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла ( $C_t$ ) в соответствующей графе таблицы результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 7

### Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора ( $C_t$ )					Результат
FAM	JOE	ROX	Sy5	Sy5.5	
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>N.meningitidis</i> серогруппы А <b>обнаружена</b>
отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>N.meningitidis</i> серогруппы В <b>обнаружена</b>
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>N.meningitidis</i> серогруппы С <b>обнаружена</b>
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>N.meningitidis</i> серогруппы W <b>обнаружена</b>
отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>N.meningitidis</i> <b>обнаружена,</b> серогруппа не определена*
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	<b>Невалидный**</b>
<u>определено</u> больше граничного <sup>4</sup>	<u>определено</u> больше граничного <sup>4</sup>	<u>определено</u> больше граничного <sup>4</sup>	<u>определено</u> больше граничного <sup>4</sup>	<u>определено</u> меньше граничного	<b>Сомнительный***</b>

\* В случае получения результата **ДНК *N.meningitidis* обнаружена, серогруппа не определена**, делается вывод о возможном присутствии в анализируемом образце другой серогруппы (не А, не В, не С и не W).

\*\* В случае получения **невалидного результата** рекомендуется провести повторное ПЦР-исследование

<sup>4</sup> Определено больше граничного по одному из каналов для флуорофоров: FAM или JOE, или ROX, или Sy5.



соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

\*\*\* В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае повторения аналогичного результата считать, что в исследуемом образце недостаточная концентрация ДНК *N.meningitidis*. Рекомендуется исключить образец из исследования.

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

**Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапа амплификации ДНК в соответствии с табл. 8 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.**

Таблица 8

**Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования**

Конт- роль	Контроли- руемый этап ПЦР-исследо- вания	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора ( <i>Ct</i> )				
		FAM	JOE	ROX	Cy5	Cy5.5
К+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного

**Возможные ошибки:**

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 7) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК ВКО *ctrA*.
2. Для отрицательного контроля ПЦР (К–) по одному или нескольким каналам для флуорофоров (см. табл. 8) 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.

3. 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.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла ( $C_t$ ), не превышающее граничных значений по двум или более каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5. Считать достоверным сигнал по каналу, для которого конечный уровень флуоресценции достигает или превышает конечный уровень флуоресценции K+.

## **СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ**

**Срок годности.** 15 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.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

### **Хранение.**

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-С, ПЦР-смеси-FL NmABCW и полимеразы (TaqF). ПЦР-буфер-С, ПЦР-смесь-FL NmABCW и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL NmABCW 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 указанного 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.ru](mailto:cs@pcr.ru)<sup>5</sup>.

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 регулирующую 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

<sup>5</sup> Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: [www.amplisens.ru](http://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 in vitro		Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изменения		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Не допускать воздействия солнечного света
	Изготовитель		Дата изготовления