

Приказом Росздравнадзора  
от 21.06.13г. № 2622-17п/13

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  
« 03 » \_\_\_\_\_ 2012 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов  
для выявления ДНК *Leishmania* spp. в биологическом  
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с  
гибридизационно-флуоресцентной детекцией  
**«АмплиСенс<sup>®</sup> Лейшманиозы-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.....  | 5  |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....  | 6  |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....                             | 7  |
| ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ....         | 9  |
| ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....                  | 9  |
| ФОРМАТ FEP .....   | 10 |
| СОСТАВ.....  | 10 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ .....  | 10 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ .....                             | 11 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ .....  | 11 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации .....                            | 11 |
| Б. Проведение амплификации .....   | 13 |
| ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» ..... | 14 |
| ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....   | 15 |
| ФОРМАТ FRT .....   | 17 |
| СОСТАВ .....   | 17 |
| ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ .....  | 17 |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ .....                             | 18 |
| ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....    | 18 |
| А. Подготовка пробирок для амплификации .....                            | 18 |
| Б. Проведение амплификации .....   | 20 |
| АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....                                  | 20 |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....                 | 23 |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....                          | 24 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

|  |   |
|--|---|
| ВКО-FL                                   | - внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией   |
| В-                                       | - отрицательный контроль экстракции   |
| 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                                      | - детекция по «конечной точке»  |
| FRT                                      | - детекция в режиме «реального времени»   |

## НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс<sup>®</sup> Лейшманиозы-FL» предназначен для выявления ДНК *Leishmania* spp. в биологическом материале (при кожном и кожно-слизистом лейшманиозах – скарификаты язв, при висцеральном лейшманиозе – биоптаты костного мозга) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

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

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК *Leishmania* spp. методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала, амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT), либо после ее завершения (формат FEP). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Пробы ДНК используются для амплификации участка ДНК перечисленных выше возбудителей при помощи специфичных к

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

этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, 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. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании формата FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании формата FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

В наборе реагентов применяется «горячий старт», что значительно снижает количество неспецифических реакций. «Горячий старт» обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы. Химически модифицированная полимераза (TaqF) активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °С в течение 15 мин.

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

**Набор реагентов выпускается в 1 формате.**

### **Формат FEP/FRT**

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

**Форма 1** включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F.

**Форма 2** включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК *Leishmania* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» и в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

**ВНИМАНИЕ!** Форма комплектации 2 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Аналитическая чувствительность

| Вид клинического материала | Комплект для экстракции ДНК | Комплект для амплификации и детекции   | Аналитическая чувствительность <sup>2</sup> , ГЭ/мл |
|----------------------------|-----------------------------|--|---|
| Скарификаты язв            | «РИБО-преп»                 | «ПЦР-комплект»<br>вариант FEP/FRT-50 F | 5x10 <sup>3</sup>                                   |
| Биоптаты костного мозга    | «РИБО-преп»                 | «ПЦР-комплект»<br>вариант FEP/FRT-50 F | 5x10 <sup>3</sup>                                   |

### Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов и образцах ДНК:

*Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Trichuris trichiura*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*; *Enterococcus faecalis* (ГИСК 29212); *Escherichia coli* (NCTC 9001); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Haemophilus influenzae*; *Haemophilus parainfluenzae*; *Haemophilus haemolyticus*; *Klebsiella oxytoca*; *Klebsiella pneumoniae*; *Listeria monocytogenes*; *Moraxella catarrhalis*; *Neisseria cinerea*; *Neisseria elongate*; *Neisseria flavescens*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Neisseria mucosa*; *Neisseria sicca*; *Neisseria subflava*; *Pantoea agglomerans*; *Proteus mirabilis*; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella enteritidis* (ГИСК 1137); *Salmonella typhi* (Central Public Health Laboratory (London) 5715); *Shigella flexneri* 2a (ГИСК 1270); *Shigella sonnei* (ГИСК 9090); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305); *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptococcus milleri*; *Streptococcus mitis*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus pyogenes*; *Streptococcus salivarius*; *Streptococcus sanguis*; *Streptococcus suis*; *Streptococcus viridians*; *Yersinia enterocolitica*; *Yersinia pseudotuberculosis* I.

<sup>2</sup> Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала.

Специфичность тестирования подтверждалась методом секвенирования детектируемых участков генома.

При проведении тестирования данной панели, а также образцов ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

## **МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

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

10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

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

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс)

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

При детекции по «конечной точке»:

11. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США)).
12. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин», «Джин-4» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (с плоской крышкой, нестрипованные):
  - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок для ПЦР объемом 0,2 мл (Gradient Palm Cyclor, GeneAmp PCR System 2700, МахуGene);
  - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок для ПЦР 0,5 мл («Терцик»).

При детекции в режиме «реального времени»:



14. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), CFX96 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
15. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
- а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Ахуген, США) или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Ахуген, США) – при использовании прибора планшетного типа;
  - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, 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 при кожном и кожно-слизистом лейшманиозах служат скарификаты язв, при висцеральном лейшманиозе – биоптаты костного мозга.

## **ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК**

Подготовка образцов проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

**ФОРМАТ FEP****СОСТАВ**

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F** – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Leishmania* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

| <i>Реактив</i>                                     | <i>Описание</i>                | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|--|--------------------------------|------------------|---------------|
| <b>ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Leishmania</i> / STI</b> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6              | 1 пробирка    |
| <b>ПЦР-смесь-2-FRT</b>                             | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3              | 1 пробирка    |
| <b>Полимераза (TaqF)</b>                           | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03             | 1 пробирка    |
| <b>ПКО ДНК <i>Leishmania</i> / STI</b>             | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2              | 1 пробирка    |
| <b>ДНК-буфер</b>                                   | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5              | 1 пробирка    |
| <b>Минеральное масло для ПЦР<sup>3</sup></b>       | Бесцветная вязкая жидкость     | 2,0              | 1 пробирка    |

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

**К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i>                | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| <b>ВКО-FL</b>  | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0              | 1 пробирка    |
| <b>ОКО</b>     | 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 используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению

<sup>3</sup> Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).

набора реагентов для выявления ДНК *Leishmania* spp. в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс<sup>®</sup> Лейшманиозы-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

### **ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп» и другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве отрицательного контроля экстракции (В–) используют **ОКО**.

### **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ**

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

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

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 1). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительного контроля (К+), отрицательного контроля (К–)) и двух пробирок «Фон». Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

#### **А. Подготовка пробирок для амплификации**

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

1. До начала работы разморозить реагенты набора, хранящиеся при температуре не выше минус 16 °С. Все

- реагенты набора тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов ДНК реагентов и пробирок «Фон».
  3. Для приготовления реакционной смеси и смеси для пробирок «Фон» необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Leishmania* /STI** и **ПЦР-смесь-2-FRT** согласно табл. 1. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
  4. Приготовить 2 пробирки «Фон». Для этого внести по **15 мкл** приготовленной смеси (без **полимеразы (TaqF)**) в две пробирки «Фон», добавить по **10 мкл ДНК-буфера**, перемешать пипетированием. Сверху раскатать по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно **25 мкл**).

Таблица 1

**Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией по «конечной точке»**

|                                     |                            | Объем реагентов на указанное кол-во реакций, мкл |                 |                   |
|-------------------------------------|----------------------------|--|-----------------|-------------------|
| Объем реагента на одну реакцию, мкл |                            | 10,0   | 5,0             | 0,50              |
| Число клинических образцов          | Число реакций <sup>4</sup> | ПЦР-смесь-1-FEP/FRT                              | ПЦР-смесь-2-FRT | Полимераза (TaqF) |
| 2                                   | 8                          | 80   | 40              | 3,0               |
| 4                                   | 10                         | 100  | 50              | 4,0               |
| 6                                   | 12                         | 120  | 60              | 5,0               |
| 8                                   | 14                         | 140  | 70              | 6,0               |
| 10                                  | 16                         | 160  | 80              | 7,0               |
| 12                                  | 18                         | 180  | 90              | 8,0               |
| 14                                  | 20                         | 200  | 100             | 9,0               |
| 16                                  | 22                         | 220  | 110             | 10,0              |
| 18                                  | 24                         | 240  | 120             | 11,0              |
| 20                                  | 26                         | 260  | 130             | 12,0              |
| 22                                  | 28                         | 280  | 140             | 13,0              |
| 24                                  | 30                         | 300  | 150             | 14,0              |
| 26                                  | 32                         | 320  | 160             | 15,0              |
| 28                                  | 34                         | 340  | 170             | 16,0              |

<sup>4</sup> Число клинических образцов + контроль этапа экстракции ДНК + 2 контроля этапа ПЦР + 2 пробирки «Фон» + запас на один образец (N+1+2+2+1, где N-количество клинических образцов).

5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить **полимеразу (TaqF)** в количестве, указанном в табл. 1. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

**ВНИМАНИЕ!** Количество добавляемого в реакционную смесь фермента полимеразы (TaqF), указанное в табл. 1, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон».

6. Внести в оставшиеся пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси. Сверху раскатать по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно **25 мкл**).

7. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

8. Поставить контрольные реакции:

а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;

б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Leishmania* / STI**;

в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из 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 амплификации (см. табл. 2).

**Программа амплификации**

|      |                 | Амплификаторы с активным регулированием температуры (по раствору в пробирке): |               |   |          |               |   | Амплификаторы с матричным регулированием температуры: |               |  |
|------|-----------------|---|---------------|---|----------|---------------|---|---|---------------|--|
|      |                 | GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология»)           |               | GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cyclер (Corbett Research) |          |               | Uno-2 (Biometra), MiniCycler, PTC-100 (MJ Research) |   |               |  |
| Цикл | Температура, °С | Время   | Кол-во циклов | Температура, °С   | Время    | Кол-во циклов | Температура, °С                                     | Время   | Кол-во циклов |  |
| 0    | 95              | пауза   |               | 95  | Пауза    |               | 95  | пауза   |               |  |
| 1    | 95              | 15 мин  | 1             | 95  | 15 мин   | 1             | 95  | 15 мин  | 1             |  |
| 2    | 95              | 10 с  | 42            | 95  | 10 с     | 42            | 95  | 1 мин   | 42            |  |
|      | 60              | 10 с  |               | 60  | 25 с     |               | 60  | 1 мин   |               |  |
|      | 72              | 10 с  |               | 72  | 25 с     |               | 72  | 1 мин   |               |  |
| 3    | 72              | 1 мин   | 1             | 72  | 1 мин    | 1             | 72  | 1 мин   | 1             |  |
| 4    | 10              | хранение  |               | 10  | хранение |               | 10  | хранение  |               |  |

2. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

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

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по двум каналам.

Таблица 3

**Соответствие мишеней и каналов флуоресцентной детекции**

| Канал для флуорофора | ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Leishmania</i> / STI |
|----------------------|---|
| FAM <sup>5</sup>     | ДНК ВКО-FL                                  |
| JOE <sup>5</sup>     | ДНК <i>Leishmania</i> spp.                  |

**ВНИМАНИЕ!** До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш, прилагаемый к набору реагентов, а также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Leishmania* spp. в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

<sup>5</sup> Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

«АмплиСенс<sup>®</sup> Лейшманиозы-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

### **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 (см. табл. 4 и методические рекомендации к инструкции).

Таблица 4

#### **Интерпретация результатов ПЦР-исследования**

| Уровень флуоресценции                           |   | Результат   |
|---|---|---|
| Канал для флуорофора FAM                        | Канал для флуорофора JOE                                  |   |
| <u>Выше</u> порогового значения                 | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | В пробе <b>не выявлена</b> ДНК <i>Leishmania</i> spp.                           |
| <u>Выше</u> или <u>Ниже</u> порогового значения | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата | В пробе <b>выявлена</b> ДНК <i>Leishmania</i> spp.                              |
| <u>Ниже</u> порогового значения                 | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата | Результат <b>невалидный</b> - проба требует повторной экстракции и амплификации |

Если значение уровня флуоресценции для пробы находится между пороговыми значениями положительного и отрицательного результата, он расценивается как **сомнительный** и требует повторения ПЦР-исследования соответствующего исследуемого образца.

**Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с табл. 5.**

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

| Контроль | Контролируемый этап | Сигнал по каналу для флуорофора |   |
|----------|---------------------|---------------------------------|---|
|          |                     | FAM                             | JOE   |
| В–       | Экстракция ДНК      | <u>Выше</u> порогового значения | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата |
| К–       | ПЦР                 | <u>Ниже</u> порогового значения | <u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата |
| К+       | ПЦР                 | <u>Выше</u> порогового значения | <u>Выше</u> порогового значения положительного результата |

**ВНИМАНИЕ!**

1. Если для положительного контроля амплификации (К+) сигнал по каналу для флуорофора JOE ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Leishmania spp.*
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля амплификации (К–) по каналу JOE сигнал выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Leishmania spp.*, начиная с этапа экстракции ДНК.



**ФОРМАТ FRT****СОСТАВ**

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» формат FEP/FRT-50 F** – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Leishmania* spp. с гибридизационно-флуоресцентной детекцией – включает:

| <i>Реактив</i>                                     | <i>Описание</i>                | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|--|--------------------------------|------------------|---------------|
| <b>ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Leishmania</i> / STI</b> | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6              | 1 пробирка    |
| <b>ПЦР-смесь-2-FRT</b>                             | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,3              | 1 пробирка    |
| <b>Полимераза (TaqF)</b>                           | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,03             | 1 пробирка    |
| <b>ПКО ДНК <i>Leishmania</i> / STI</b>             | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2              | 1 пробирка    |
| <b>ДНК-буфер</b>                                   | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5              | 1 пробирка    |
| <b>Минеральное масло для ПЦР</b>                   | Бесцветная вязкая жидкость     | 2,0              | 1 пробирка    |

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

**К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы экстракции:**

| <i>Реактив</i> | <i>Описание</i>                | <i>Объем, мл</i> | <i>Кол-во</i> |
|----------------|--------------------------------|------------------|---------------|
| <b>ВКО-FL</b>  | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0              | 1 пробирка    |
| <b>ОКО</b>     | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2              | 1 пробирка    |

**ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ**

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления ДНК *Leishmania* spp. в биологическом материале методом полимеразной цепной

реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс<sup>®</sup> Лейшманиозы-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

## **ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ**

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп» и другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве отрицательного контроля экстракции (В–) используют **ОКО**.

## **ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ 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.

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. табл. 6). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительного контроля (К+) и отрицательного контроля (К–)). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

### **А. Подготовка пробирок для амплификации**

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

1. До начала работы разморозить реагенты набора, хранящиеся при температуре не выше минус 16 °С. Все реагенты набора тщательно перемешать на вортексе и

- осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
  3. Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Leishmania* / STI, ПЦР-смесь-2-FRT** и **полимеразу (TaqF)** в количестве, указанном в табл. 6. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
  4. Внести в отобранные пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.

Таблица 6

**Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»**

| Объем реагента на одну реакцию, мкл |                            | Объем реагентов на указанное кол-во реакций, мкл |                 |                   |
|-------------------------------------|----------------------------|--|-----------------|-------------------|
|                                     |                            | 10,0   | 5,0             | 0,5               |
| Число клинических образцов          | Число реакций <sup>6</sup> | ПЦР-смесь-1-FEP/FRT                              | ПЦР-смесь-2-FRT | Полимераза (TaqF) |
| 2                                   | 6                          | 60   | 30              | 3,0               |
| 4                                   | 8                          | 80   | 40              | 4,0               |
| 6                                   | 10                         | 100  | 50              | 5,0               |
| 8                                   | 12                         | 120  | 60              | 6,0               |
| 10                                  | 14                         | 140  | 70              | 7,0               |
| 12                                  | 16                         | 160  | 80              | 8,0               |
| 14                                  | 18                         | 180  | 90              | 9,0               |
| 16                                  | 20                         | 200  | 100             | 10,0              |
| 18                                  | 22                         | 220  | 110             | 11,0              |
| 20                                  | 24                         | 240  | 120             | 12,0              |
| 22                                  | 26                         | 260  | 130             | 13,0              |
| 24                                  | 28                         | 280  | 140             | 14,0              |
| 26                                  | 30                         | 300  | 150             | 15,0              |
| 28                                  | 32                         | 320  | 160             | 16,0              |

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. Поставить контрольные реакции:

<sup>6</sup> Число клинических образцов + контроль этапа экстракции ДНК + 2 контроля этапа ПЦР + запас на один образец (N+1+2+1, где N-количество клинических образцов).

- а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера;
- б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *Leishmania* / STI;
- в) отрицательный контроль экстракции (В-) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из ОКО.

**Б. Проведение амплификации**

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

Таблица 7

**Программа амплификации для приборов роторного<sup>7</sup> и планшетного типа<sup>8</sup>**

| Цикл | Температура, °С | Время                              | Кол-во циклов |
|------|-----------------|------------------------------------|---------------|
| 1    | 95              | 15 мин                             | 1             |
| 2    | 95              | 10 с                               | 45            |
|      | 60              | 25 с<br>детекция флуоресц. сигнала |               |
|      | 72              | 10 с                               |               |

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по двум каналам - для флуорофоров FAM<sup>9</sup> и JOE<sup>9</sup> (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

**АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с

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

<sup>8</sup> Например, iCycler iQ5, Mx3000P, CFX96, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

<sup>9</sup> Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Leishmania* spp.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 8 и вкладышем, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 8

**Интерпретация результатов ПЦР-исследования**

| Значение порогового цикла                                |  | Результат   |
|--|--|---|
| Канал для флуорофора FAM                                 | Канал для флуорофора JOE                                   |   |
| <u>Меньше</u> граничного значения                        | Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения | В пробе <b>не выявлена</b> ДНК <i>Leishmania</i> spp.                           |
| <u>Больше</u> или <u>меньше</u> граничного значения      | <u>Меньше</u> граничного значения                          | В пробе <b>выявлена</b> ДНК <i>Leishmania</i> spp.                              |
| <u>Отсутствует</u> или <u>больше</u> граничного значения | <u>Отсутствует</u> или <u>больше</u> граничного значения   | Результат <b>невалидный</b> - проба требует повторной экстракции и амплификации |

**ВНИМАНИЕ!** Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Leishmania* spp. в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Лейшманиозы-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

**Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей**

амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 9.

Таблица 9

**Результаты контролей различных этапов ПЦР-исследования**

| Контроль | Контролируемый этап ПЦР-исследования | Значение порогового цикла, <i>Ct</i>                       |  |
|----------|--------------------------------------|--|--|
|          |                                      | по каналу для флуорофора FAM                               | по каналу для флуорофора JOE                               |
| В–       | Экстракция ДНК                       | <b>Меньше</b> граничного значения                          | Значение отсутствует или <b>больше</b> граничного значения |
| К–       | ПЦР                                  | Значение отсутствует или <b>больше</b> граничного значения | Значение отсутствует или <b>больше</b> граничного значения |
| К+       | ПЦР                                  | <b>Меньше</b> граничного значения                          | <b>Меньше</b> граничного значения                          |

**ВНИМАНИЕ!**

1. Если для положительного контроля этапа ПЦР (К+) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не была выявлена ДНК *Leishmania* spp.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла *Ct* меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Leishmania* spp., начиная с этапа экстракции ДНК.

## СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

**Срок годности.** 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

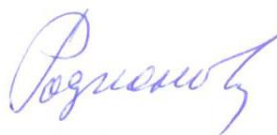
**Транспортирование.** Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

**Хранение.** Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Leishmania* / STI, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1- FEP/FRT *Leishmania* / STI хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® Лейшманиозы-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>10</sup>

Заведующий НПЛ ОМДиЭ  
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

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



Е.Л.Никонов

<sup>10</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

**REF**

Номер в каталоге



Осторожно!  
Обратитесь к  
сопроводительной  
документации

**LOT**

Код партии



Максимальное  
число тестов

**IVD**

Изделие для in vitro  
диагностики



Использовать до

**VER**

Дата изменения



Обратитесь к  
руководству по  
эксплуатации



Ограничение  
температуры



Не допускать  
попадания  
солнечного света



Производитель



Дата  
изготовления