Приказом Росздравнадзора
от 09.06.12г. № 2857-Пр/12

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.И.Покровский
«30» июня 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для одновременного выявления и количественного определения ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Микоплазмы-FL»

АмплиСенс®

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

IVD

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

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 9
СОСТАВ 10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 11
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 12
А. Подготовка пробирок для амплификации 12
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 14
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 14
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 18
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей 20
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 21

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Микоплазмы-FL»** предназначен для одновременного выявления и количественного определения ДНК *Ureaplasma parvum, Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* методом мультиплексной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Материалом для исследования служат пробы ДНК, полученные путем экстракции из соскобного отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры) и первой порции мочи.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Клинический материал забирается и помещается в транспортную среду для хранения и транспортировки клинического материала. Из полученных клинических образцов выделяется (экстрагируется) ДНК, которая служит материалом для проведения ПЦР. Выявление и количественное определение ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* осуществляется методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» (ПЦР в «реальном времени»).

Количественное определение ДНК методом ПЦР в «реальном времени» основывается на существовании

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

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

линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из клинических образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

В предлагаемом тесте концентрация ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* определяется в двух вариантах. В **первом варианте** определяется количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов в 1 мл клинического образца (ГЭ/мл). Полученные таким образом значения отражают абсолютную концентрацию данных микроорганизмов в клиническом материале. Во **втором варианте** рассчитывается соотношение количества геномов *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* на количество геномов клеток слизистой человека. Для этой цели в ПЦР-смеси наряду с праймерами и зондами к *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* присутствуют праймеры и зонды к фрагменту гена β-глобина человека, а в растворах ДНК-калибраторов наряду с калибраторами ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* присутствуют калибраторы человеческой ДНК. Полученные таким образом относительные значения концентрации ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* к ДНК человека могут отражать плотность обсемененности данными микроорганизмами клеток слизистой. Кроме того, ДНК человека является эндогенным внутренним контролем, отражающим качество получения клинического материала.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект»

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

вариант FRT-200 F.

Форма 3 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 4 включает комплекты реагентов, «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 5 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации фрагментов ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего взятие клинического материала, экстракцию из него ДНК и амплификацию ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 5 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 5 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл[2]
Соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	«Транспортная среда для мазков» или «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» или транспортная среда «ТС-ЭДЭМ»	«ДНК-сорб-АМ»	*Ureaplasma parvum*	$1x10^3$
			Ureaplasma urealyticum	$1x10^3$
			Mycoplasma hominis	$1x10^3$
Моча (первая порция)	—	«ДНК-сорб-АМ»	*Ureaplasma parvum*	$2x10^3$
			Ureaplasma urealyticum	$2x10^3$
			Mycoplasma hominis	$2x10^3$

Линейный диапазон измерений

Линейный диапазон измерений для количественного определения каждого из выявляемых микроорганизмов составляет от 10^3 до 10^7 ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Gardnerella vaginalis, Lactobacillus* spp., *Escherichia coli, Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida albicans, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria* spp., *Mycoplasma genitalium, Trichomonas vaginalis, Treponema pallidum, Toxoplasma gondii, HSV* 1 и 2 типа, *CMV, HPV.*

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-

[2] Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала, помещенного в указанную транспортную среду.

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

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.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

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

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. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ТУ 9398-098-01897593-2009), или «Транспортная среда для мазков» (ТУ 9398-088-01897593-2009), или транспортная среда «ТС-ЭДЭМ», или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1, 2.
2. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (ТУ 9398-036-01897593-2009) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1, 2.
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии

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

Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплектом» вариант FRT-100F, «ПЦР-комплектом» вариант FRT-200 F:
    а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axygen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Материалом для исследования служит соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, помещенное в транспортные среды, выпускаемые или рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, а также образцы первой порции мочи.

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

СОСТАВ

Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем,*	*Кол-во*
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость[3]	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

К комплекту реагентов «ДНК-сорб-АМ» прилагаются следующие реагенты:

Реактив	*Описание*	*Объем,*	*Кол-во*
ВКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3, 4.

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ):

Реактив	*Описание*	*Объем,*	*Кол-во*
Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)	Прозрачная жидкость розового цвета	0,5	100 пробирок

Входит в состав формы комплектации 3.

Транспортная среда для мазков:

Реактив	*Описание*	*Объем,*	*Кол-во*
Транспортная среда для мазков	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок

Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для одновременной амплификации и количественного определения ДНК *Ureaplasma parvum,*

[3] При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

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

Ureaplasma urealyticum и *Mycoplasma hominis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив		*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *U.parvum / U.urealyticum / M.hominis*		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	**UG1**	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
	UG2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F – комплект реагентов для одновременной амплификации и количественного определения ДНК *Ureaplasma parvum, Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает**:

Реактив		*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FL *U.parvum / U.urealyticum / M.hominis*		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	4 пробирки
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	**UG1**	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
	UG2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из клинических образцов;
- Проведение амплификации с гибридизационно-

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

флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»;
- Анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из клинического материала необходимо использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» или другие комплекты, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для проведения количественного ПЦР-исследования в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Недопустимо использование комплекта реагентов «ЭДЭМ» и других экспресс-методов экстракции ДНК.

При работе с формами выпуска набора 3 и 4 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

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

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением эксперимента. Смешивать реагенты из расчета расходования на одну реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FL** ***U.parvum / U.urealyticum / M.hominis***
- **5 мкл** смеси **ПЦР-смеси-2-FRT** и **полимеразы (TaqF)**

1. Предварительно необходимо подготовить **смесь ПЦР-смеси-2-FRT** и **полимеразы (TaqF)**. Содержимое одной пробирки с **полимеразой (TaqF) (30 мкл)** необходимо полностью перенести в пробирку с **ПЦР-смесью-2-FRT (300 мкл)** и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату

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

приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на 60 реакций. Смесь хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций).

2. Встряхнуть на вортексе пробирку с **ПЦР-смесью-1-FL *U.parvum / U.urealyticum / M.hominis***, сбросить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице, приведенной в приложении 1.** Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку еще **4-х контрольных реакций: UG1, UG2; К- и В-**.

Необходимо брать реагенты с запасом: для тестирования N образцов приготовить реагенты для (N+1) реакций.

3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FL *U.parvum / U.urealyticum / M.hominis***, **ПЦР-смеси-2-FRT** с **полимеразой (TaqF)**, приготовленной согласно п.1.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
   а) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В-) –** внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.
   б) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
   в) **калибраторы (UG1, UG2)** – в 2 пробирки внести по **10 мкл** каждого ДНК калибратора **(UG1, UG2).**

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

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

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

Таблица 1

Программа «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа[4]			Приборы планшетного типа[5]		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	5 с	5	**95**	5 с	5
	60	20 с		**60**	20 с	
	72	15 с		**72**	15 с	
3	**95**	5 с	40	**95**	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		**72**	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red (при одновременном проведении других 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 в

[4] Например, Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

[5] Например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3000 и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

«реальном времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам:

- по каналу для флуорофора **FAM/Green** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *U.parvum*;**
- по каналу для флуорофора **JOE/Yellow** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *U.urealyticum*;**
- по каналу для флуорофора **ROX/Orange** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ***ДНК M.hominis*;**
- по каналу для флуорофора **Cy5/Red** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК человека**, которая служит эндогенным внутренним контролем.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема кривой, что определяет наличие (или отсутствие) для данной ДНК-мишени значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов программного обеспечения прибора. В соответствии со значениями *Ct* калибраторов автоматически происходит построение калибровочной прямой и расчет концентраций ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* и ДНК человека.

Результат количественного ПЦР-исследования считается недостоверным:

1. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) регистрируется сигнал по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange. В этом случае необходимо повторить ПЦР-исследование всех образцов, для которых определено значение порогового цикла по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange.
2. Появление любого значения Calc Conc (копий на реакцию) более 5 в таблице результатов для отрицательного контрольного образца этапа экстракции (ОК) и/или этапа ПЦР (К–) на канале Cy5/Red свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются

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

недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, в которых регистрируется сигнал по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

3. Если для ДНК калибраторов ПЦР (UG1, UG2) значения порогового цикла по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и Cy5/Red отсутствуют или разница в *Ct* не укладывается в диапазон, указанный во вкладыше. В этом случае необходимо повторить амплификацию всех образцов.
4. Если в клиническом материале отсутствует ДНК человека. В этом случае необходимо повторно провести взятие клинического материала и ПЦР-исследование.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов указываются во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Выражение конечного результата концентрации ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* возможно в двух вариантах – в абсолютных и в относительных (нормированных) значениях.

Абсолютные значения концентрации *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis*

Абсолютные значения концентраций ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* отражают общее содержание данных микроорганизмов во взятом клиническом материале, помещенном в транспортную среду. По заданным значениям калибраторов ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* программой прибора автоматически рассчитываются исходные значения количества копий ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* в реакции и выдаются в соответствующей графе в таблице результатов (см. описание для вашего прибора). Полученные значения используют для расчета количества геномных эквивалентов *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* в 1 мл исходного клинического образца:

[Число копий] ДНК *Up (Uu, Mh)* X 200 = [Число геномных эквивалентов]

***Up (Uu, Mh)* на 1 мл (ГЭ/мл)**

автоматически рассчитываются исходные значения **Относительные (нормированные) значения концентрации**

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

ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis*

Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток слизистой человека. Кроме того, значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия клинического материала.

По заданным значениям калибраторов ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* и заданным значениям калибраторов ДНК человека программой прибора количества копий ДНК *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* и количество копий ДНК человека в реакции и выдаются в соответствующих графах в таблице результатов (см. описание для используемого прибора). Полученные значения количества геномных эквивалентов *U.parvum, U.urealyticum* и *M.hominis* нормируют на 100 тысяч клеток человека согласно формуле:

$$\frac{\text{[Число копий] ДНК } \textit{Up (Uu, Mh)}}{\text{[Число копий] ДНК человека}} \text{ X 200000 = [Число ГЭ] } \textit{Up (Uu, Mh)} \text{ на } 10^5 \text{ клеток человека}$$

Клиническая интерпретация результатов теста должна проводиться врачом только при условии комплексного обследования пациента, с учетом данных анамнеза, клинического и эпидемиологического статуса, в соответствии с существующими клиническими и методическими рекомендациями.

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F и вариант FRT-200 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ», «Транспортную среду для мазков», «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» хранить при температуре от 2 до 25 °С.

ВКО комплексный, ВКО-FL и ОКО (из комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ») хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *U.parvum / U.urealyticum / M.hominis* хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

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

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс®** **ФлороЦеноз / Микоплазмы-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)[6].

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

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

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

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

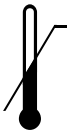
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей

	Объем реагентов на указанное количество реакций (мкл)	
Объем реагентов на одну реакцию (мкл)	**10 мкл**	**5 мкл**
Количество исследуемых клинических образцов*	**ПЦР-смесь-1-FL *U.parvum* / *U.urealyticum* / *M.hominis****	**Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)***
1	**60**	**30**
2	**70**	**35**
3	**80**	**40**
4	**90**	**45**
5	**100**	**50**
6	**110**	**55**
7	**120**	**60**
8	**130**	**65**
9	**140**	**70**
10	**150**	**75**
11	**160**	**80**
12	**170**	**85**
13	**180**	**90**
14	**190**	**95**
15	**200**	**100**
16	**210**	**105**
17	**220**	**110**
18	**230**	**115**
19	**240**	**120**
20	**250**	**125**
21	**260**	**130**
22	**270**	**135**
23	**280**	**140**
24	**290**	**145**
25	**300**	**150**
30	**350**	**175**

* Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки 4 контрольных реакций: UG1, UG2, B- и K-.

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
LOT	Код партии		Максимальное число тестов
IVD	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Верхнее ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		

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