УТВЕРЖДАЮ
Врио директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.В. Малеев
«27» июня 2017 г.

# ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для одновременного выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* (видов *Parvum* и *Urealyticum*), *Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma hominis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах, выделенных из клинических образцов

## «АмплиСенс® *C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium/ M.hominis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL»

**АмплиСенс®**

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

IVD

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

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

| | |
|---|---|
| ПЦР | Полимеразная цепная реакция |
| ИППП | Инфекции, передаваемые половым путем |
| ПКО | Положительный контрольный образец |
| ВКО-FL | Внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией |
| ОКО | Отрицательный контрольный образец |
| 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® *C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium / M.hominis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL»** предназначен для одновременного выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* (видов *Parvum* и *Urealyticum*), *Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma hominis* путем амплификации специфических фрагментов ДНК данных микроорганизмов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из соскобного отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки; отделяемого конъюнктивы глаз; образцов мочи; секрета предстательной железы человека. Выделение ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). Для процедуры выделения ДНК из клинических образцов используются соответствующие наборы реагентов, производимые или рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ДЕТАЛИЗИРОВАННАЯ ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ И ТИПА ИСПОЛЬЗУЕМОГО ОБОРУДОВАНИЯ ИЗЛОЖЕНА В МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЯХ «ИССЛЕДОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА НАЛИЧИЕ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИППП И ДРУГИХ ИНФЕКЦИЙ ОРГАНОВ РЕПРОДУКЦИИ МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ».



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

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на одновременной амплификации в одной пробирке (формат «мультиплекс-ПЦР») и детекции в режиме «реального времени» участков ДНК *C.trachomatis*, *Ureaplasma* (видов *Parvum* и *Urealyticum*), *M.genitalium* и *M.hominis*, а также участка внутреннего контрольного образца (ВКО). Реакционная смесь содержит олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые гибридизационные зонды (ФМ-зонды), которые комплементарны внутренним специфическим участкам амплифицируемого фрагмента. Флуоресцентный сигнал, испускаемый ФМ-зондом, детектируется оптическим блоком амплификатора непосредственно в процессе реакции в реальном времени. ФМ-зонды для каждой из мишеней имеют свою длину волны, что позволяет регистрировать сигнал по соответствующему каналу. Для детекции четырех возбудителей и ВКО используется амплификатор с 5 – 6-канальным оптическим блоком. Характерной особенностью данного комплекта реагентов является сохранение аналитической чувствительности для каждого из микроорганизмов даже при многократном избытке всех остальных (например, при диагностике микстинфекций).

**Набор реагентов выпускается в одном варианте.**

**Вариант FRT,** предназначенный для проведения исследования методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». При использовании данного варианта набора детекция флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении специфического продукта амплификации, осуществляется непосредственно в ходе проведения ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

## ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

**Форма 1** включает «ПЦР-комплект» вариант FRT.

**Форма 2** включает «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

## СОСТАВ

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT** для ПЦР-амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* (видов *Parvum* и *Urealyticum*), *Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma*



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

*hominis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

| *Реактив* | *Описание* | *Объем (мл)* | *Кол-во* |
|---|---|---|---|
| **ПЦР-смесь-1-FL *C.trachomatis/Ureaplasma/ M.genitalium /M.hominis*** раскапана под воск | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,01 | 110 пробирок объемом 0,2 мл |
| **ПЦР-смесь-2-FL-red** | Прозрачная жидкость красного цвета | 1,1 | 1 пробирка |
| **ПКО комплексный** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| **ДНК-буфер** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

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

**Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F** для ПЦР-амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* (видов *Parvum* и *Urealyticum*), *Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma hominis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

| *Реактив* | *Описание* | *Объем (мл)* | *Кол-во* |
|---|---|---|---|
| **ПЦР-смесь-1-FL *C.trachomatis/ Ureaplasma/M.genitalium /M.hominis*** | Прозрачная бесцветная жидкость | 1,2 | 1 пробирка |
| **ПЦР-смесь-2-FRT** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,6 | 1 пробирка |
| **Полимераза (TaqF)** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,06 | 1 пробирка |
| **ПКО комплексный** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,2 | 1 пробирка |
| **ДНК-буфер** | Прозрачная бесцветная жидкость | 0,5 | 1 пробирка |

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

## 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»,



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

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[1], 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

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



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

лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром[2]. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- 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 клинико-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.

[2] Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.



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

- 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 безопасен.

## ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Пятиканальный амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», например, «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия) или аналогичные.
2. Бокс для стерильных работ (ПЦР-бокс).
3. Центрифуга/вортекс.
4. Автоматические пипетки (дозаторы) переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с комплектами вариант FRT-100 F - от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
5. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 100 мкл в штативах.
6. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл.
7. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл (при работе с комплектом реагентов вариант FRT-100 F):
   — тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (плоская крышка), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, «Corbett Research», Австралия; «Qiagen», Германия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК..
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.



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

10. Емкость для сброса наконечников.

## ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

### Вариант FRT. ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»

### A. Подготовка пробирок для ПЦР

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

### A1. Подготовка пробирок для проведения ПЦР при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

**Общий объем реакции – 30 мкл, объем пробы ДНК – 10 мкл.**

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL** ***C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium / M.hominis*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска раскапать по **10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL** ***C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium / M.hominis***.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате выделения из исследуемых клинических или контрольных образцов.
4. Поставить **контрольные реакции**:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – вместо пробы ДНК внести в подготовленную пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
   б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО комплексного**.
   в) **отрицательный контроль выделения (В-)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

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

**Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы ДНК – 10 мкл.**

1. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. Для проведения N реакций (включая 2 контроля ПЦР)



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

смешать в отдельной пробирке 10*(N+1) мкл **ПЦР-смеси-1-FL *C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium / M.hominis***, 5,0*(N+1) мкл **ПЦР-смеси-2-FRT** и 0,5*(N+1) мкл **полимеразы (TaqF)**.

3. Перемешать подготовленную смесь на центрифуге/вортексе и осадить кратковременным центрифугированием.
4. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате выделения из исследуемых клинических или контрольных образцов.
6. Поставить **контрольные реакции**:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – вместо пробы ДНК внести в подготовленную пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
   б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО комплексного**.
   в) **отрицательный контроль выделения (В-)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.
7. Установить пробирки в реакционный модуль.
8. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.
9. По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

## Проведение ПЦР-амплификации и детекции, анализ и учет результатов при использовании прибора «Rotor-Gene» 6000 («Corbett Research», Австралия) и «Rotor-Gene Q» («Qiagen», Германия)

### Программирование прибора «Rotor-Gene» и создание шаблона теста.

Для работы с прибором «Rotor-Gene» 6000 и «Rotor-Gene Q» следует использовать программу Rotor-Gene 6000 версии 1.7 (build 67) или выше.

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

1. Для программирования и создания шаблона следует выбрать в окне *New Run/Новый тест* режим программирования



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

*Advanced/Детальный мастер*. Выбрать любой шаблон (например, *Hydrolysis probes/Флуоресцентные зонды (TaqMan)*) для редактирования и нажать кнопку *New/Новый.* В следующем окне выбрать тип ротора *36-Well Rotor/36-луночный ротор* или *72-Well Rotor/72-луночный ротор.*

2. В окне, следующем после окна выбора ротора, необходимо установить объем реакционной смеси *Reaction Volume (µL)/ Объем реакции* равный **25**. Установить галочку в боксе в строке ***15 µL oil layer volume/15 µL объем масла/воска***, чтобы активировать эту нужную опцию.
3. В окне *Edit Profile/Редактор профиля* следует задать программу **«АмплиСенс-1»**:

**Программа «АмплиСенс-1»:**

1. Hold/Удерж. Темп-ры 95 °C – 15 мин
2. Cycling/Циклирование 95 °C – 5 с
   60 °C – 20 с
   72 °C – 15 с
   Cycle repeats/Цикл повторить – 5 times/раз.
3. Cycling 2/Циклирование 2 95 °C – 5 с
   60 °C – 20 с – Детекция[3]
   72 °C -15 с
   Cycle repeats/Цикл повторить – 40 times/раз.

Программа «АмплиСенс-1» является универсальной для выявления ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции, включая все тесты для выявления и характеристики вирусов папилломы человека (ВПЧ ВКР) с помощью комплектов реагентов «ПЦР-комплект» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). (См. Методические рекомендации «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией»). Поэтому можно одновременно в одном приборе проводить все эти тесты или любое их сочетание.

4. Задать автоматическую калибровку для выбора параметра «*gain*»/«у*силение сигнала*». Для этого в окне *Channel Setup/Установки каналов* выбрать кнопку *Gain Optimisation/Опт.уровня сигн*. В открывшемся окне *Auto Gain*

[3] Детекция флуоресценции *(Acquiring to Cycling A/*Детек.на *Cycling A)* по каналам Green, Yellow, Orange, Red и Crimson включается на втором шаге (60 °C) второго блока циклирования.



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

*Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала* нажать кнопку *Optimise Acquiring/Опт. Детек-мых,* пометить галочкой бокс в строке *Perform Optimisation Before 1-st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции.* Для канала *Green* нужно указать в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **5***,* а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **10.** Для канала *Yellow* нужно указать в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **4***,* а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **8.** Для канала *Orange* нужно указать в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **4***,* а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **8.** Для канала *Red* нужно указать в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **4***,* а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **8.** Для канала *Crimson* нужно указать в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение **4***,* а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение **8.** В графе *Tube position/Позиция Пробирки* указан номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «*gain*»/«*усиление сигнала*». По умолчанию это – 1-я пробирка в роторе. Поэтому в 1-ой позиции в роторе должна ставиться пробирка с реакционной смесью (любой)[4]. Закрыть окно *Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала.*

5. Перейти в следующее окно. Сохранить запрограммированный шаблон выполнения теста. Для этого нажать кнопку ***Save Template*/*Сохр.шаблон***. Задать имя для файла шаблона, соответствующее названию заданной в нем программы амплификации и детекции **«АмплиСенс-1»**. Сохранить файл в предлагаемую папку: *Templates/Шаблоны* и в ней в папку *Quick Start Templates* закрыть окно *New Run Wizard/Мастер Нового Теста.* После этого запрограммированный шаблон теста появится в списке шаблонов в окне *New Run/Новый тест.*

[4] При одновременном проведении в приборе нескольких различных тестов для выявления ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции с помощью комплектов реагентов «ПЦР-комплект» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) для автоматической калибровки по параметру «*gain*»/«*усиление сигнала*» можно использовать пробирку с любой из подготовленных реакционных смесей, помещенную в 1-ю позицию в роторе. При одновременном проведении тестов в формате «мультипрайм» с помощью комплектов реагентов «ПЦР-комплект» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в 1-ю позицию в роторе необходимо помещать пробирку с реакционной смесью для теста в формате «мультипрайм».



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

**Проведение амплификации и детекции с использованием готового шаблона.**

1. Установить пробирки в ротор. При этом в первой позиции должна быть установлена одна из подготовленных для анализа пробирок с реакционной смесью. Установить фиксирующее кольцо, прикрепить ротор, совместив отверстие для фиксатора с фиксатором, закрыть крышку прибора.
2. Для запуска с использованием готового шаблона выбрать в меню *New/Новый,* вверху окна *New Run/Новый тест* выбрать вкладку *Advanced Start/Детальный мастер*, затем в списке шаблонов в этом окне выбрать нужный, запрограммированный согласно предыдущему разделу, шаблон с программой амплификации и детекции **«АмплиСенс-1»**. Для перемещения к следующему окну используйте кнопку *Next/Далее.*
3. В окне выбора ротора выбрать тип ротора ***36-Well Rotor/36-луночный ротор*** или ***72-Well Rotor/72-луночный ротор***. Поставить галочку в боксе *Locking Ring Attached/Кольцо закреплено.* Перейти в следующее окно, нажав кнопку *Next/Далее.*
4. В следующем окне необходимо убедиться, что в боксе ***15 µL oil layer volume /15 µL объем масла/воска*** установлена галочка, активирующая эту опцию, и выше указан объем реакционной смеси *Reaction Volume (µL)/Объем реакции* равный **25**.
5. В следующем окне можно проверить правильность программы амплификации и детекции и условий автоматического выбора параметра «gain»/«усиление сигнала», заданных в шаблоне, в соответствии с пунктом 1. Перейти в следующее окно, нажав кнопку *Next/Далее.*
6. В последнем перед стартом окне запустить выполнение программы прибором с помощью кнопки ***Start Run/Старт*** в нижней части окна. При этом ротор должен быть уже прикреплен и крышка прибора закрыта. Задать имя файла, в котором будут сохранены результаты, и нажать кнопку ***Save/Сохранить***.
7. В окне таблицы образцов задать последовательность расположения образцов в роторе, указав для каждого



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

образца его имя (идентификатор) и тип *Unknown/Образец*. Нажать кнопку ***Finish/OK*.**

8. После окончания выполнения программы амплификации приступить к учету результатов.

**ВНИМАНИЕ!** После окончания выполнения программы амплификации пробирки удаляют из ротора и утилизируют.

**Примечание –** Нельзя использовать для заполнения ротора пробирки с ПЦР-смесью, ранее уже прошедшие амплификацию. Ячейки ротора необходимо заполнять пустыми пробирками или оставлять незаполненными.

**Анализ и учет результатов.**

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по пяти каналам – анализируются с помощью программного обеспечения прибора «**Rotor-Gene» 6000 или «Rotor-Gene Q».** Сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК *C.trachomatis,*** детектируется по каналу **Green,** участка **ДНК *Ureaplasma*** – по каналу **Yellow**, участка **ДНК *M.genitalium*** – по каналу **Orange**, участка **ДНК *M.hominis*** – по каналу **Crimson.** Накопление продукта амплификации **ДНК ВКО** детектируется по каналу **Red.**

Анализируют результаты амплификации фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma (видов Parvum и Urealyticum), Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis* и ДНК ВКО. 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.

1. Выбрать в главном меню значок меню ***Analysis/Анализ***, в ниспадающем меню выбрать вкладку ***Quantitation/Количественный***. Выполнить операцию для данных канала Green, выбрав в поле «*Cycling A Green*», для данных канала Yellow, выбрав в поле «*Cycling A Yellow*», для данных канала Orange, выбрав в поле «*Cycling A Orange*», для данных канала Crimson, выбрав в поле «*Cycling A Crimson*», затем для данных канала Red, выбрав в поле «*Cycling A Red*».



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

2. Анализ результатов амплификации ДНК *C.trachomatis,* детектируемых по каналу Green. Щелкнуть кнопкой мыши на графике нормализованных кривых флуоресценции по каналу **Green.** В меню над графиком должна быть включена кнопка ***Dynamic Tube/Динамич. Фон*** (включена по умолчанию). Задать уровень пороговой линии – в меню ***CT Calculation/Вычисление CT*** ввести в текстовом поле ***Threshold/Порог*** значение **0,1.** Нажав кнопку ***Outlier Removal/Устранение выбросов***, ввести в текстовом поле значение **0** (0 %). Внизу под графиком появится таблица результатов с указанием значения порогового цикла *Ct* по каналу Green для каждого образца («*Quant. Resultes – Cycling A. Green»*/*«Количественные результаты – Cycling A. Green»*).
3. Анализ результатов амплификации ДНК *Ureaplasma* (видов *Parvum* и *Urealyticum*), детектируемых по каналу Yellow. Щелкнуть кнопкой мыши на графике нормализованных кривых флуоресценции по каналу **Yellow.** В меню над графиком должна быть включена кнопка ***Dynamic Tube/Динамич. Фон*** (включена по умолчанию). Задать уровень пороговой линии – в меню ***CT Calculation/Вычисление CT*** ввести в текстовом поле ***Threshold/Порог*** значение **0,1.** Нажав кнопку ***Outlier Removal/Устранение выбросов***, ввести в текстовом поле значение **5** (5 %). Внизу под графиком появится таблица результатов с указанием значения порогового цикла *Ct* по каналу Yellow для каждого образца («*Quant. Resultes – Cycling A. Yellow»*/*«Количественные результаты – Cycling A. Yellow»*).
4. Анализ результатов амплификации ДНК *M.genitalium,* детектируемых по каналу Orange. Щелкнуть кнопкой мыши на графике нормализованных кривых флуоресценции по каналу **Orange.** В меню над графиком должна быть включена кнопка ***Dynamic Tube/Динамич. Фон*** (включена по умолчанию). Задать уровень пороговой линии – в меню ***CT Calculation/Вычисление CT*** ввести в текстовом поле ***Threshold/Порог*** значение **0,1.** Нажав кнопку ***Outlier Removal/Устранение выбросов***, ввести в текстовом поле значение **5** (5 %). Внизу под графиком появится таблица



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

результатов с указанием значения порогового цикла *Ct* по каналу Orange для каждого образца («*Quant. Resultes – Cycling A. Orange»*/*«Количественные результаты – Cycling A. Orange»*).

5. Анализ результатов амплификации ДНК *M.hominis,* детектируемых по каналу Crimson. Щелкнуть кнопкой мыши на графике нормализованных кривых флуоресценции по каналу **Crimson.** Включить в меню над графиком кнопки ***Dynamic Tube/Динамич.фон*** (включена по умолчанию), кнопку ***Slope Correct/Коррект.уклона***. Задать уровень пороговой линии – в меню ***CT Calculation/Вычисление CT*** ввести в текстовом поле ***Threshold/Порог*** значение **0,1.** Нажав кнопку ***Outlier Removal/Устранение выбросов***, ввести в текстовом поле значение **20** (20 %). Внизу под графиком появится таблица результатов с указанием значения порогового цикла *Ct* по каналу Crimson для каждого образца («*Quant. Resultes – Cycling A. Crimson»*/*«Количественные результаты – Cycling A. Crimson»*).
6. Анализ результатов амплификации ДНК ВКО, детектируемых по каналу Red. Щелкнуть кнопкой мыши на графике нормализованных кривых флуоресценции по каналу **Red,** включить в меню над графиком кнопки ***Dynamic Tube/Динамич.фон*** (включена по умолчанию), кнопку ***Slope Correct/Коррект.уклона***, затем кнопку ***Outlier Removal/Устранение выбросов*** и ввести в текстовом поле значение **5** (5 %). Задать уровень пороговой линии – в меню ***CT Calculation/Вычисление CT*** ввести в текстовом поле ***Threshold/Порог*** значение **0,07.** Внизу под графиком появится таблица результатов с указанием значения порогового цикла по каналу Red для каждого образца (*«Quant. Resultes – Cycling A. Red»*/*«Количественные результаты – Cycling A. Red»*).

Результаты интерпретируются следующим образом:

- **ДНК *Chlamydia trachomatis* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Green («*Quant. Results – Cycling A. Green»*/*«Количественные результаты – Cycling A. Green»*) определено значение порогового цикла ***Ct*.** При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать



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

пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **ДНК *Ureaplasma (видов Parvum и Urealyticum)* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Yellow («*Quant. Resultes – Cycling A. Yellow*»/«*Количественные результаты – Cycling A. Yellow*») определено значение порогового цикла ***Ct*.** При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции**.**

- **ДНК *Mycoplasma genitalium* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Orange («*Quant. Resultes – Cycling A. Orange*»/«*Количественные результаты – Cycling A. Orange*») определено значение порогового цикла ***Ct*.** При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции**.**

- **ДНК *Mycoplasma hominis* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Crimson («*Quant. Resultes – Cycling A. Crimson*»/«*Количественные результаты – Cycling A. Crimson*») определено значение порогового цикла ***Ct*.** При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции**.**

- **ДНК *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma (видов Parvum и Urealyticum), Mycoplasma genitalium*** и ***Mycoplasma hominis* не обнаружены** если для данной пробы в таблице результатов соответственно по каналам Green, Yellow, Orange и Crimson не определены (отсутствуют) значения порогового цикла *Ct* (кривые флуоресценции не пересекают пороговую линию), а в таблице результатов по каналу Red определено значение порогового цикла *Ct,* не превышающее 33.

- Результат анализа **невалидный,** если для данной пробы не определено (отсутствует) или превышает 33 значение порогового цикла *Ct* по каналу для детекции Red и не определено (отсутствует) или превышает 35 значение порогового цикла Ct по каналам Green, Yellow, Orange и Crimson. В этом случае требуется повторно провести ПЦР для данной пробы. В случае, если повторно получен аналогичный



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

результат, требуется повторить исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа выделения ДНК.

7. Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл 1).

**Таблица 1.**

**Правильные результаты контрольных реакций**

| Контрольная реакция | Контролируемый этап ПЦР-исследования | *Ct* по каналам Green, Yellow, Orange и Crimson | *Ct* по каналу Red |
|---|---|---|---|
| В- | Выделение ДНК | Значение отсутствует | Определено значение меньше 33 |
| К- | ПЦР | Значение отсутствует | Значение отсутствует |
| К+ | ПЦР | Определено значение меньше 35 | Определено значение меньше 33 |

**Возможные ошибки.**

Положительный результат, т.е. пересечение с пороговой линией, зафиксированное для пробы ДНК, на графике флуоресценции которого отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Это может свидетельствовать о неправильно заданном уровне пороговой линии или параметров расчета базальной линии. Такой результат не должен рассматриваться как положительный. Если он получен при правильном уровне пороговой линии, требуется повторно провести ПЦР для этого образца.

## СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

**Срок годности.** 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

**Хранение.** Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium /*



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

*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.

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® *C.trachomatis/ Ureaplasma/ M.genitalium/ M.hominis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL»** направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru [6].

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

Главный врач ФГБУ «Поликлиника №1»
Управления делами Президента
Российской Федерации Е.В. Ржевская

[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

# СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

| | | | |
|---|---|---|---|
|  | Номер по каталогу |  | Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению |
|  | Код партии |  | Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов |
|  | Медицинское изделие для диагностики in vitro |  | Использовать до |
|  | Дата изменения |  | Обратитесь к инструкции по применению |
|  | Температурный диапазон |  | Не допускать воздействия солнечного света |
|  | Изготовитель |  | Дата изготовления |



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