Приказом Росздравнадзора
от 09.06.12г. № 2851-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 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 8
СОСТАВ 9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 10
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 11
А. Подготовка пробирок для амплификации 11
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 12
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 13
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 16
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей 17
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 18

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 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

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

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

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» 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

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

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.

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,*

[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

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 1.3.2322-08 «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. При контакте

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

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 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;

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

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

[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

ФОРМАТ FRT

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

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

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 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).

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

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).**

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).

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

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 «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*;**

[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

- 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 и/или Cy5/Red. В этом случае необходимо повторить ПЦР-исследование всех образцов, для которых определено значение порогового цикла по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange и/или Cy5/Red.
2. 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.
3. 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,*

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

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)

Относительные (нормированные) значения концентрации 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 автоматически рассчитываются исходные значения 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:

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

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.

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



Номер в каталоге



Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации



Код партии



Максимальное число тестов



Изделие для in vitro диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель

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