

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 15.05.2012 № 2354-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
«15» февраля 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации ДНК *U.parvum* и
U.urealyticum в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *U.parvum* / *U.urealyticum*-FL»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА...10	
ФОРМАТ FEP	11
СОСТАВ.....	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	13
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ.....	13
А. Подготовка пробирок для амплификации	13
Б. Проведение амплификации.....	15
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	15
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	16
ФОРМАТ FRT	19
СОСТАВ.....	19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	21
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	21
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	23
А. Подготовка пробирок для амплификации	23
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ...	24
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	25
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	29
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией
В-	- отрицательный контроль экстракции
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *U.parvum* / *U.urealyticum*-FL» предназначен для выявления и дифференциации ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* путем амплификации специфического фрагмента ДНК данных микроорганизмов методом ПЦР с гибридационно-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.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *U.parvum* и *U.urealyticum* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию фрагмента ДНК данного микроорганизма и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT),

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

либо после ее завершения (формат FEP). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция одновременной амплификации фрагментов ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* при помощи специфичных к каждому из них праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. К олигонуклеотидным зондам, специфичным к различным ДНК-мишеням, прикреплены различные флуоресцентные метки. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации каждой ДНК-мишени путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании формата FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании формата FRT - непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах.

Формат FEP

Набор реагентов выпускается в 8 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-1000 (пробирки 0,5 мл).

Форма 4 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки

Формат FEP Форма 1: **REF** B19-100-R0,5-FEP; **REF** H-1671-2-5; Форма 2: **REF** B19-100-R0,2-FEP; **REF** H-1672-2-2;

Формат FRT Форма 1: **REF** R-B19; **REF** H-1671-1-2; Форма 2: **REF** R-B19-F(RG,IQ); **REF** H-1672-1 /

0,5 мл).

Форма 5 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл).

Форма 6 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Форма 7 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду для мазков» 100 пробирок по 0,5 мл, «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл).

Форма 8 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения амплификации ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 4, 5, 6 и 7 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая взятие клинического материала, экстракцию из него ДНК и амплификацию ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 8 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 8 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 8 формах комплектации:

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

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

Формат FEP Форма 1: [REF](#) B19-100-R0,5-FEP; [REF](#) H-1671-2-5; Форма 2: [REF](#) B19-100-R0,2-FEP; [REF](#) H-1672-2-2;

Формат FRT Форма 1: [REF](#) R-B19; [REF](#) H-1671-1-2; Форма 2: [REF](#) R-B19-F(RG,iQ); [REF](#) H-1672-1 /

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-1000 F.

Форма 4 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» 100 пробирок по 0,5 мл, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

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

Форма 6 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 7 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 8 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения амплификации фрагментов ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* с гибридационно-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 4, 5, 6 и 7 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включая взятие клинического материала, экстракцию из него ДНК и амплификацию ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 8 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 8 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Формат FEP Форма 1: [REF](#) B19-100-R0,5-FEP; [REF](#) H-1671-2-5; Форма 2: [REF](#) B19-100-R0,2-FEP; [REF](#) H-1672-2-2;

Формат FRT Форма 1: [REF](#) R-B19; [REF](#) H-1671-1-2; Форма 2: [REF](#) R-B19-F(RG,iQ); [REF](#) H-1672-1 /

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Микро-организм	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ²
Соскобное отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	<i>Ureaplasma parvum</i>	1x10 ³
			<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1x10 ³
Моча ³	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	<i>Ureaplasma parvum</i>	5x10 ³
			<i>Ureaplasma urealyticum</i>	5x10 ³

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и панели образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Gardnerella vaginalis*; *Lactobacillus* spp.; *Escherichia coli*; *Staphylococcus* spp.; *Streptococcus* spp.; *Candida albicans*; *Mycoplasma hominis*; *Ureaplasma urealyticum*; *Ureaplasma parvum*; *Mycoplasma genitalium*; *Chlamydia trachomatis*; *Neisseria* spp.; *Trichomonas vaginalis*; *Neisseria gonorrhoeae*; *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:

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

³ Требуется предобработка образцов мочи.

- 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.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ТУ 9398-098-01897593-2009) или «Транспортная среда для мазков» (ТУ 9398-088-01897593-2009), или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1–3 (формат FEP и формат FRT).
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 1–3 (формат FEP и формат FRT).
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-100 F – 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 мл 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.

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FEP:

12. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) или аналогичные).
13. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
14. Пластиковая пипетка для минерального масла (для работы с «ПЦР-комплексом» вариант FEP-1000).

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT:

15. Программируемый амплификатор с системой детекции

Формат FEP Форма 1: **REF** B19-100-R0,5-FEP; **REF** H-1671-2-5; Форма 2: **REF** B19-100-R0,2-FEP; **REF** H-1672-2-2;

Формат FRT Форма 1: **REF** R-B19; **REF** H-1671-1-2; Форма 2: **REF** R-B19-F(RG,iQ); **REF** H-1672-1 /

флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией»).

16. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-100 F:

- а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия; Qiagen, Германия) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Материалом для исследования служат соскобное отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, отделяемого конъюнктивы глаз, образцы мочи (осадок первой порции утренней мочи), секрет предстательной железы человека.

ФОРМАТ FEP**СОСТАВ**

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ⁴	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
TE-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
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 4, 5, 6 и 7.

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ):

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)	Прозрачная жидкость розового цвета	0,5	100 пробирок

Входит в состав форм комплектации 4 и 6.

Транспортная среда для мазков:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем,</i>	<i>Кол-во</i>
Транспортная среда для мазков	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок

Входит в состав форм комплектации 5 и 7.

⁴ При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FEP

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>U.parvum</i> / <i>U.urealyticum</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон-red ⁵	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ⁶	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
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 FEP-1000 – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>U.parvum</i> / <i>U.urealyticum</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	1100 пробирок объемом 0,5 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	5,5	2 флакона
ПЦР-смесь-Фон-red ⁵	Прозрачная жидкость красного цвета	2,5	1 флакон
Минеральное масло для ПЦР ⁶	Бесцветная вязкая жидкость	40	1 флакон
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 1100 реакций

⁵ Реагент используется при исследовании проб ДНК, выделенных с помощью наборов «ДНК-сорб-АМ» или «ДНК-сорб-В»

⁶ Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).

амплификации, включая контроли.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов;
- Проведение амплификации.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту. Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

При использовании форм комплектации набора 4–7 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ»

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-

смесью-1-FL *U.parvum* / *U.urealyticum* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

2. В пробирки с **ПЦР-смесью-1-FL *U.parvum* / *U.urealyticum*** на поверхность застывшего воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL *U.parvum* / *U.urealyticum***.
3. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
4. Приготовить образец «Фон». Для этого в пробирку с **ПЦР-смесью-1-FL *U.parvum* / *U.urealyticum*** на поверхность застывшего воска внести **20 мкл ПЦР-смеси-Фон-red**. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).

ВНИМАНИЕ! Реагент **ПЦР-смесь-Фон-red** используется при исследовании проб ДНК, выделенных с помощью наборов «ДНК-сорб-АМ» или «ДНК-сорб-В». При использовании других наборов реагентов для экстракции ДНК, рекомендованных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, необходимо следовать инструкции к используемому набору.

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных путем экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
6. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО комплексного**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В–)** – внести в пробирку **10 мкл пробы**, выделенной из ОКО.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратковременным (1-3 с) центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования «АмплиСенс-1-FEP» (см. табл 1).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Таблица 1

Программа «АмплиСенс-1-FEP»

Цикл	«Терцик»			GeneAmp PCR System 2700			Gradient Palm Cycler, MaxyGene		
	Температура, °С	Время	Циклы	Температура, °С	Время	Циклы	Температура, °С	Время	Циклы
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	5 мин	1	95	5 мин	1	95	5 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
5	10	Хранение		10	Хранение		10	Хранение	

Примечание – Программы термоциклирования для других моделей амплификаторов описаны в методических рекомендациях «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией».

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *U.parvum*;

Формат FEP Форма 1: **REF** B19-100-R0,5-FEP; **REF** H-1671-2-5; Форма 2: **REF** B19-100-R0,2-FEP; **REF** H-1672-2-2;

Формат FRT Форма 1: **REF** R-B19; **REF** H-1671-1-2; Форма 2: **REF** R-B19-F(RG,iQ); **REF** H-1672-1 /

- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК *U.urealyticum*;
- по каналу ROX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, полученных путем экстракции из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **ДНК *U.parvum* обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу FAM выше установленного для этого канала порогового значения положительного результата.
- **ДНК *U.urealyticum* обнаружена**, если для данной пробы сигнал по каналу HEX выше установленного для этого канала порогового значения положительного результата.
- **ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* не обнаружены**, если для данной пробы сигнал по каналам FAM и HEX ниже установленных для этих каналов пороговых значений отрицательного результата, а сигнал по каналу ROX выше установленного порогового значения.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по всем трем каналам ниже установленных для этих каналов пороговых значений.

Если для пробы получен **невалидный** или **сомнительный** результат, требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналам FAM и HEX	Сигнал по каналу ROX	Обозначение результата в программах некоторых детекторов
B-	Экстракция ДНК	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Выше</u> порогового значения	«-» или «ОК»
K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения	«нд»
K+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения	«+» или «ОК»

ВНИМАНИЕ!

- 1 Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал по каналам FAM и (или) HEX ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, для которых, соответственно, сигнал по каналам FAM и (или) HEX ниже порогового значения положительного результата.
- 2 Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (B-) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) сигнал по каналам FAM или (и) HEX выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых, соответственно, сигнал по

ФОРМАТ FEP

каналам FAM или (и) HEX выше порогового значения положительного результата.

Формат FEP Форма 1: **REF** B19-100-R0,5-FEP; **REF** H-1671-2-5; Форма 2: **REF** B19-100-R0,2-FEP; **REF** H-1672-2-2;

Формат FRT Форма 1: **REF** R-B19; **REF** H-1671-1-2; Форма 2: **REF** R-B19-F(RG,iQ); **REF** H-1672-1 /

VER 15.02.12 / стр. 18 из 31

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ⁷	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
TE-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

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

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
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 4, 5, 6 и 7.

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ):

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)	Прозрачная жидкость розового цвета	0,5	100 пробирок

Входит в состав форм комплектации 4 и 6.

Транспортная среда для мазков:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Транспортная среда для мазков	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок

Входит в состав форм комплектации 5 и 7.

⁷ При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>U.parvum</i> / <i>U.urealyticum</i> 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 – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>U.parvum</i> / <i>U.urealyticum</i>	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
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-1000 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>U.parvum</i> / <i>U.urealyticum</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	10 пробирок
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	5 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 1100 реакций амплификации, включая контроли.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору. Экстракцию ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

ФОРМАТ FRT

При использовании форм комплектации набора 4–7 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.

А1. Подготовка пробирок для амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

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

А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F и FRT-1000 F

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

1. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT. Перемешать

Формат FEP Форма 1: **REF** B19-100-R0,5-FEP; **REF** H-1671-2-5; Форма 2: **REF** B19-100-R0,2-FEP; **REF** H-1672-2-2;

Формат FRT Форма 1: **REF** R-B19; **REF** H-1671-1-2; Форма 2: **REF** R-B19-F(RG,IQ); **REF** H-1672-1 /

- содержимое пробирок с реагентами **ПЦР-смесь-1-FL *U.parvum* / *U.urealyticum*, ПЦР-смесь-2-FRT, полимеразы (TaqF)** и осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
 3. Для проведения N реакций (включая 2 контроля ПЦР) смешать в отдельной пробирке $10 \cdot (N+1)$ мкл **ПЦР-смеси-1-FL *U.parvum* / *U.urealyticum***, $5,0 \cdot (N+1)$ мкл **ПЦР-смеси-2-FRT** и $0,5 \cdot (N+1)$ мкл **полимеразы (TaqF)**.
 4. Перемешать подготовленную смесь и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1-2 с).
 5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
 6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
 7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО комплексного**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В-)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

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. 3).

Программа «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа ⁸			Приборы планшетного типа ⁹		
	Температура, °С	Время	Число повторов циклов	Температура, °С	Время	Число повторов 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, JOE, ROX (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 используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал,

⁸ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

⁹ Например, iCycler, iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *U.parvum*;

- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *U.urealyticum*;
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации 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.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **ДНК *U.parvum* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **FAM** определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК *U.urealyticum* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для детекции флуорофора **JOE** определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;
- **ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов соответственно по каналам для флуорофоров FAM и JOE не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу для детекции флуорофора ROX и по каналам для

флуорофоров FAM и JOE. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 4).

Таблица 4

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, C_t	
		по каналу для флуорофоров FAM, JOE	по каналу для флуорофора ROX
B–	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
K–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
K+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

- 1 Если для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла по каналам для флуорофоров FAM и (или) JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, для которых отсутствует значение порогового цикла, соответственно, по каналам для флуорофоров FAM и (или) JOE.
- 2 Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (B–) или/и отрицательного контроля ПЦР (K–) по каналам для флуорофоров FAM или (и) JOE определено значение

ФОРМАТ FRT

порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла, соответственно, по каналам для флуорофоров FAM или (и) JOE.

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 FRT-1000 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* 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® *U.parvum* / *U.urealyticum-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)¹⁰.

¹⁰ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»



Е.Л. Никонов

Управления делами Президента Российской Федерации

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		

Формат FEP Форма 1: **REF** B19-100-R0,5-FEP; **REF** H-1671-2-5; Форма 2: **REF** B19-100-R0,2-FEP; **REF** H-1672-2-2;

Формат FRT Форма 1: **REF** R-B19; **REF** H-1671-1-2; Форма 2: **REF** R-B19-F(RG,iQ); **REF** H-1672-1 /

VER 15.02.12 / стр. 31 из 31