

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 6.11.09г. № 8933-17п/09

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека

В.И.Покровский
«20» 08 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для одновременного выявления ДНК *Neisseria gonorrhoeae*,
Chlamydia trachomatis, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas*
vaginalis методом полимеразной цепной реакции с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах,
выделенных из клинических образцов

**«АмплиСенс® *N.gonorrhoeae* / *C.trachomatis* /
M.genitalium / *T.vaginalis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL»**

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
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	Федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов «АмплиСенс® *N.gonorrhoeae* / *S.trachomatis* / *M.genitalium* / *T.vaginalis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» предназначен для одновременного выявления ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* 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 уrogenитального 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 ФГУН ЦНИИЭ 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 ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ»

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Метод основан на одновременной амплификации в одной пробирке (формат «мультиплекс-ПЦР») и детекции в режиме «реального времени» участков ДНК *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis spp.*, *M.genitalium* и *T.vaginalis*, 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».

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает «ПЦР-комплект» вариант FRT.

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

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

СОСТАВ.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT для ПЦР-амплификации ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>N.gonorrhoeae</i> / <i>C.trachomatis</i> / <i>M.genitalium</i> / <i>T.vaginalis</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 для ПЦР-амплификации ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>N.gonorrhoeae</i> / <i>C.trachomatis</i> / <i>M.genitalium</i> / <i>T.vaginalis</i>	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.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-1000 F для ПЦР-амплификации ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>N.gonorrhoeae</i> / <i>C.trachomatis</i> /<i>M.genitalium</i> /<i>T.vaginalis</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.

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» и методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III – IV групп патогенности».

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

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.
 10. Емкость для сброса наконечников.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ.

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

А. Подготовка пробирок для ПЦР.

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

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

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL *N.gonorrhoeae* / *C.trachomatis* / *M.genitalium* / *T.vaginalis*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска раскатать по **10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL *N.gonorrhoeae* / *C.trachomatis* / *M.genitalium* / *T.vaginalis***.
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 и FRT-1000 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) смешать в отдельной пробирке $10 \cdot (N+1)$ мкл **ПЦР-смеси-1-FL *N.gonorrhoeae* / *C.trachomatis* / *M.genitalium* / *T.vaginalis***, $5,0 \cdot (N+1)$ мкл **ПЦР-смеси-2-FRT** и $0,5 \cdot (N+1)$ 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 *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 °С - 15 мин
2. Cycling/Циклирование 95 °С - 5 с
60°С - 20 с
72 °С - 15 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 5 times/раз.
3. Cycling 2/Циклирование 2 95 °С - 5 с
60 °С - 20 с – Детекция¹
72 °С -15 с
Cycle repeats/Цикл повторить – 40 times/раз.

Программа «АмплиСенс-1» является универсальной для

¹ Детекция флуоресценции (*Acquiring to Cycling A/Детек.на Cycling A*) по каналам Green, Yellow, Orange, Red и Crimson включается на втором шаге (60 °С) второго блока циклирования.

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 ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). (См. «Методика проведения исследования клинического материала на наличие ДНК возбудителей ИППП методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией», 2008 г.). Поэтому можно одновременно в одном приборе проводить все эти тесты или любое их сочетание.

4. Задать автоматическую калибровку для выбора параметра «*gain*»/«усиление сигнала». Для этого в окне *Channel Setup/Установки каналов* выбрать кнопку *Gain Optimisation/Опт.уровня сигн.* В открывшемся окне *Auto Gain 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)². Закройте 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/Сохранить 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*.

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 μ L oil layer volume/15 μ L объем масла/воска** установлена

² 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 ФГУН ЦНИИЭ 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 ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) в 1-ю позицию в роторе необходимо помещать пробирку с реакционной смесью для теста в формате «мультипрайм».

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 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 *N.gonorrhoeae*** детектируется по каналу **Green**, участка **ДНК *C.trachomatis*** – по каналу **Yellow**, участка **ДНК *M.genitalium*** – по каналу **Orange**, участка **ДНК *T.vaginalis*** – по каналу **Crimson**. Накопление продукта амплификации **ДНК ВКО** детектируется по каналу **Red**.

Анализируют результаты амплификации фрагментов ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma*

genitalium, *Trichomonas vaginalis* 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 выпадающем 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*».
2. Анализ результатов амплификации ДНК *N.gonorrhoeae*, 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 *S.trachomatis*, 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 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 *T.vaginalis*, 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 **10** (10 %). 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 *Neisseria gonorrhoeae* обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу Green («*Quant. Resultes – Cycling A. Green*»/«*Количественные результаты – Cycling A. Green*») определено значение порогового цикла **Ct**. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- **ДНК *Chlamydia trachomatis* 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 *Trichomonas vaginalis* 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 *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*,**

Mycoplasma genitalium и ***Trichomonas vaginalis*** 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 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	<i>Ct</i> по каналам Green, Yellow, Orange и Crimson	<i>Ct</i> 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.

УТИЛИЗАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.

Утилизацию набора реагентов проводят в соответствии с СП 2.1.7.728-99.

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 и FRT-1000 F при получении разуконплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *N.gonorrhoeae* / *C.trachomatis* / *M.genitalium* / *T.vaginalis* 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® *N.gonorrhoeae* / *C.trachomatis* / *M.genitalium* / *T.vaginalis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» направлять в ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123,

г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Заведующий НПЛ



Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний
Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК
им.Тарасевича Роспотребнадзора



Г.М.Игнатъев