

« У Т В Е Р Ж Д А Ю »

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко
« _____ » _____ 2009 г.
№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления рРНК *Chlamydia trachomatis*,

полученной из клинического материала, методом NASBA

в режиме «реального времени»

«АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ»

«СОГЛАСОВАНО»

И.о. директора ФГУН ГИСК
им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора

Мовсесянц А.А.
2009 г.

« 26 » 06

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

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

«26» / 06 В.И.Покровский
2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления рРНК *Chlamydia trachomatis*,

полученной из клинического материала, методом NASBA

в режиме «реального времени»

«АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ»

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ» предназначен для выявления рРНК *Chlamydia trachomatis* в клиническом материале методом NASBA в режиме «реального времени».

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБОТЕСТ-сорб» и «РИБОТЕСТ-NASBA». Форма предназначена для ручной экстракции.

Форма 2 включает комплект реагентов «РИБОТЕСТ-NASBA». Форма предназначена для автоматической экстракции.

ВНИМАНИЕ! При работе с **формой 2** заявленные аналитические характеристики набора реагентов гарантируются только в случае выделения РНК при помощи автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция).

Форма комплектации 1 предназначена для полного анализа, включая выделение нуклеиновых кислот из клинического материала, амплификации РНК *Chlamydia trachomatis* методом NASBA в режиме «реального времени».

Набор реагентов рассчитан на 60 тестов, включая контроли.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «РИБОТЕСТ-сорб» - комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Лизирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	27	1 флакон
Отмывочный буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	44	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	2 флакона
Сорбент	Суспензия белого цвета	0,8	2 пробирки
РНК-элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение нуклеиновых кислот из 60 проб, включая контроли.

* При хранении лизирующего буфера и отмывочного буфера при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов «РИБОТЕСТ-NASBA» - комплект реагентов для амплификации РНК *Chlamydia trachomatis* методом NASBA в режиме «реального времени» включает:

Реактив	Описание	Объем (мл) Масса (мг)	Кол-во
Гранула с ферментами (цветовой код – красный)	Шарик белого цвета	5,0 мг	6 штук
Растворитель фермента (цветовой код – красный)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5 мл	1 пробирка
Гранула с реагентами (цветовой код – синий)	Шарик белого цвета	6,5 мг	6 штук
Растворитель реагентов (цветовой код – синий)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6 мл	1 пробирка
Раствор KCl (цветовой код – желтый)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5 мл	1 пробирка
DEPC-H₂O (цветовой код – белый)	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5 мл	1 пробирка
СТ-Mix	Прозрачная розовая жидкость	0,05 мл	1 пробирка
ПКО СТ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ВКО СТ-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,11	5 пробирок
Транспортная среда для мазков	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Для проведения анализа используется следующий материал:

– соскоб эпителиальных клеток из урогенитального тракта женщин

Цервикальный канал. Удаляют слизь с поверхности шейки матки тампоном, вводят зонд в цервикальный канал на 1-1,5 см и вращают его в течение 3-5 с. Извлекают зонд и помещают его в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой для мазков. Погрузив рабочую часть зонда в пробирку с 500 мкл транспортной среды для мазков, вращают зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку. Для выделения нуклеиновых кислот используется 100 мкл образца.

Уретра. Перед взятием соскоба из уретры необходимо обработать ее наружное отверстие тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором (0,9 % раствор NaCl). Производят массаж уретры пальцем со стороны влагалища, прижимая ее к лобковой

кости. Вводят зонд в уретру на глубину 1-1,5 см и аккуратно, не поранив слизистую, несколькими вращательными движениями производят соскоб эпителиальных клеток и переносят зонд в пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в пробирку с 500 мкл транспортной среды для мазков, вращают зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку. Для выделения нуклеиновых кислот используется 100 мкл образца.

– **соскоб эпителиальных клеток из уретры мужчин**

Перед взятием соскоба из уретры необходимо обработать головку полового члена в области наружного отверстия уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Производят массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удаляют их сухим тампоном. Вводят зонд в уретру на глубину 3-4 см. Несколько вращательными движениями производят соскоб эпителиальных клеток и переносят зонд в пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в пробирку с 500 мкл транспортной среды для мазков, вращают зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку. Для выделения нуклеиновых кислот используется 100 мкл образца.

– **моча**

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20-40 мл в сухой стерильный флакон или сухую стерильную пробирку. Взбалтывают флакон с мочой. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин при 10 тыс g (12 тыс об/мин на центрифуге). Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удаляют надосадочную жидкость, не захватывая осадок. К осадку добавляют транспортную среду до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Материал допускается хранить при комнатной температуре в течение 1 сут, при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 нед, при температуре не выше минус 16 °С - в течение 1 мес, при температуре не выше минус 68 °С - более 1 мес.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.

2. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
3. Анализ проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».
4. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
5. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка NASBA, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ NASBA-Real-Time.

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

ЗОНА 1.

Для этапа выделения нуклеиновых кислот из клинического материала требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс безопасности II тип А).
2. Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных и механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
5. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
7. Холодильник от 2 до 8 °С.
8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.
10. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).



11. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия; «Hettish», Германия).
12. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
13. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл (например, «Axygen», США).
14. Штатив для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Axygen», США).

При использовании автоматической станции «NucliSens[®] easyMAG[™]» дополнительно требуется:

1. Автоматическая станция для выделения РНК/ДНК «NucliSens[®] easyMAG[™]» (поставщик «ИнтерЛабСервис», Россия).
2. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции «NucliSens[®] easyMAG[™]» (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнетизированная силика) («bioMérieux», Франция).

ЗОНА 2.

Для проведения NASBA-Real-Time требуются:

1. Анализатор и программное обеспечение «NucliSens[®] EasyQ» («bioMérieux», Франция), «Rotor-Gene» 3000/6000 («CorbettResearch», Австралия) или «iQ iCycler» и «iQ5» («BioRad», США).
2. Инкубатор «NucliSens[®] EasyQ» («bioMérieux», Франция).
3. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-»Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Набор электронных и механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпинет», Россия).
6. Штатив-контейнер для пробирок 0,2 мл с крышкой («bioMérieux», Франция).
7. Устройство для закрывания пробирок («bioMérieux», Франция).
8. Стрипованные пробирки (например, PCR -0208-С, «Axygen», США).
9. Стрипованные крышки (например, PCR-02CP-С, «Axygen», США).
10. Мини-центрифуга для стрипованных пробирок ($\pm 6\ 000$ об/мин, 2 000 g) («bioMérieux», Франция).
11. Центрифуга для пробирок на 1,5 мл (до 10 000 g) (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
12. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.

13. Емкость с дезинфицирующим раствором.
14. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ ПРОБ.

(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала).

Выделение РНК из исследуемого материала с помощью автоматической станции «NucliSens® easyMAG™» («bioMérieux», Франция) описано в Приложении 1.

ВНИМАНИЕ! Для работы необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free». Работу проводят только в одноразовых перчатках, которые меняют при каждой операции. Избегайте касания пробирок с реагентами для NASBA руками без перчаток.

Порядок работы.

1. До начала процедуры прогрейте флаконы с **лизирующим буфером** и **отмывочным буфером** при температуре 25-37 °С до полного растворения кристаллов. В процессе прогрева периодически перемешивайте флаконы. Убедитесь, что кристаллы лизирующего буфера и отмывочного буфера полностью растворились. Охладите до комнатной температуры.
2. Подготовьте необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль выделения). Внесите на стенку пробирок (кроме пробирки положительного контроля выделения) по **10 мкл ВКО СТ-rec**. Затем внесите по **400 мкл лизирующего буфера**. Промаркируйте пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим буфером** и **ВКО СТ-rec** внесите по **100 мкл проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внесите **100 мкл транспортной среды для мазков**. Закройте пробирки после внесения образца.
4. Плотнo закрытые пробирки тщательно перемешайте на вортексе и центрифугируйте в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.
5. Тщательно ресуспендируйте **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером добавьте по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента**. Закройте пробирки и перемешайте их на вортексе.
6. Оставьте пробирки на 10 мин при комнатной температуре. Во избежание оседания частиц сорбента на дно пробирки регулярно (каждые 2 мин) перемешивайте.

7. Центрифугируйте пробирки для осаждения сорбента 30 с при 10 тыс об/мин. Удалите надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя. Используйте отдельный наконечник без аэрозольного барьера для каждой пробы.
 8. Добавьте по **500 мкл отмывочного буфера** в каждую пробирку. Перемешайте на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугируйте 30 с при 10 тыс об/мин. Удалите надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя. Используйте отдельный наконечник без аэрозольного барьера для каждой пробы.
 9. Добавьте в пробирки **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендируйте сорбент на вортексе. Центрифугируйте 30 с при 10 тыс об/мин. Удалите надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя. Используйте отдельный наконечник без аэрозольного барьера для каждой пробы.
 10. Повторите отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя пункту 9.
 11. Добавьте в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендируйте сорбент на вортексе. Центрифугируйте 30 с при 10 тыс об/мин. Полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без аэрозольного барьера, используя вакуумный отсасыватель.
 12. Поместите пробирки в термостат при температуре $(56 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
 13. По окончании сушки добавьте по **50 мкл РНК-элюента** в каждую пробирку, используя наконечник с аэрозольным барьером. Перемешайте пробирки на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Поместите в термостат при температуре $(56 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 5 мин.
- Примечание - По истечении 2 мин перемешайте пробирки на вортексе во избежание оседания сорбента на дно пробирки.
14. Центрифугируйте 2 мин при 10 тыс об/мин.
 15. Надосадочную жидкость используется для постановки реакции NASBA-Real-time.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» (NASBA-Real-Time).
(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения амплификации).

ВНИМАНИЕ! При работе необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

I. Приготовление рабочих растворов реагентов на 10 реакций.

(При постановке большего количества проб реактивы рекомендуется объединить).

Порядок работы:

1. Перенесите пробирки с образцами прошедшими пробоподготовку в помещение для амплификации.
2. Включите анализатор («NucliSens® EasyQ», «Rotor-Gene» 3000/6000 или «iQ iCycler» и «iQ5») дайте ему как минимум 15 мин прогреться.
3. Создайте или выберите протокол анализа как описано в Приложении 2 для «NucliSens® EasyQ», в Приложении 3 для «iQ iCycler» и «iQ5» или в Приложении 4 для «Rotor-Gene» 3000/6000.
4. Перед добавлением всех реагентов их необходимо разморозить, перемешать и осадить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 3 с.
5. Приготовьте раствор ферментов. Добавьте **50 мкл растворителя ферментов** (цветовой код - красный) к **одной грануле с ферментами** (цветовой код - красный). Оставьте на 10-15 мин при комнатной температуре. Перемешайте раствор ферментов потряхиванием. **Не используйте вортекс!** Осадите капли центрифугированием в течение 3 с. Используйте полученный раствор в течение 1 ч.
6. Приготовьте **Смесь-1** (после добавления каждого компонента немедленно хорошо перемешайте на вортексе): последовательно добавьте к **одной грануле с реагентами** (цветовой код - синий) **70 мкл растворителя реагентов** (цветовой код - синий), **8 мкл DEPC-H₂O** (цветовой код - белый) и **16 мкл раствора KCl** (цветовой код - желтый). **Не центрифугируйте полученный раствор!**
7. Приготовьте **Смесь-2**: добавьте **8 мкл СТ-Mix** к **Смеси-1**. Перемешайте на вортексе. Используйте в течение 30 мин после приготовления. **Не центрифугируйте!**
Если полученная **Смесь-2** не прозрачная, выдержите при температуре 65 °С в течение 5 мин и снова перемешайте на вортексе. **Не используйте раствор с осадком!**

Готовый раствор ферментов можно хранить в течение 2 нед при температуре не выше минус 68 °С при условии, что раствор заморожен сразу после приготовления. Повторно замораживать раствор нельзя. **Смесь-1 и Смесь-2 хранению не подлежат!**

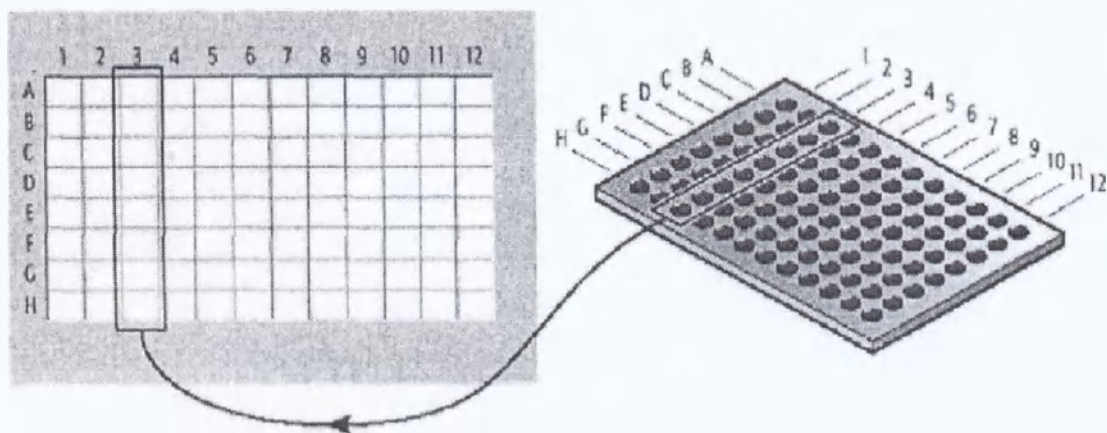
II. Проведение амплификации.

А. Проведение реакции амплификации на анализаторе «NucliSens® EasyQ» или «iQ iCycler» и «iQ5».

Порядок работы.

1. Приготовьте необходимое количество стрипованных пробирок. Поместите стрипы на 8 пробирок в штатив как показано на рисунке. Правила размещения стрипов: чередуйте ряды со стрипами с пустыми рядами. Например, при помещении стрипа с 8 пробирками в первый ряд штатива второй ряд оставляйте пустым, следующий стрип

помещайте в третий ряд и т.д. Нумерация гребенки штатива соответствует схеме в программе:



2. Перенос экстракта:

Перенесите **5 мкл** экстракта РНК на дно отдельной пробирки в позиции, как указано на рисунке. Визуально проверьте, что все внесенные в пробирки экстракты РНК находятся на дне пробирок. После внесения компонентов накройте штатив крышкой во избежание загрязнения проб.

3. Поставьте контрольные реакции амплификации:

а) положительный контроль (К+) – внести 5 мкл ПКО СТ

б) отрицательный контроль (К-) – внести 5 мкл DEPC-H₂O

4. В каждую пробирку стрипа (содержащую 5 мкл экстракта РНК) внесите на дно 10 мкл Смеси-2. Визуально проверьте, что Смесь-2 была добавлена во все пробирки.

5. Поместите штатив в инкубатор «NucliSens® EasyQ». Убедитесь, что инкубатор прогрелся до температуры 65°C и установлена программа:

65 °C – 2 мин

41 °C – 2 мин

hold – 41°C

Накройте штатив крышкой (**крышку инкубатора не закрывать!**) и инкубируйте по заданной программе.

6. В это время поместите необходимое количество крышек для пробирок в другой штатив дном вниз и внесите на внутреннюю поверхность крышек по **5 мкл раствора ферментов**.

7. По окончании второго этапа инкубации (2 мин при температуре 41 °C) не вынимая пробирки из инкубатора аккуратно закройте их крышками с раствором ферментов, используя устройство для закрывания пробирок.

8. Пометьте каждый стрип. Убедитесь, что крышки находятся в правильном порядке

(цель в стрипе с крышками направлена к нумерованной стороне штатива).

Визуально проверьте, что все пробирки тщательно закрыты.

9. Перенесите стрипы в мини-центрифугу для стрипов. Центрифугируйте пробирки 2 с.
10. Перемешайте, постукивая пальцами по пробиркам, и повторите центрифугирование. Убедитесь, что реактивы во всех пробирках тщательно перемешаны.
11. Немедленно верните пробирки в инкубатор в соответствующее положение до тех пор, пока процедура добавления раствора ферментов и перемешивания не будет выполнена для всех стрипов.
12. Перенесите штатив со стрипами в предварительно прогретый до температуры 41 °C анализатор «NucliSens® EasyQ» или «iQ iCycler» и «iQ5» в течение 5 мин после добавления ферментов и начните амплификацию (См. приложение 2 для «NucliSens® EasyQ», приложение 3 для «iQ iCycler» и «iQ5»). **Не открывайте анализатор в ходе амплификации!**
13. По окончании амплификации осторожно выньте штатив и сбросьте пробирки в закрывающийся контейнер. Убедитесь, что пробирки не открылись в ходе амплификации.
14. Проведите анализ результатов (см. приложение 2 для «NucliSens® EasyQ», приложение 3 для «iQ iCycler» и «iQ5»).

Б. Проведение реакции амплификации на амплификаторе «Rotor-Gene» 3000/6000.

Порядок работы.

1. Приготовьте необходимое количество пробирок. Поместите их в штатив.
2. Перенос экстракта: перенесите **5 мкл** экстракта РНК (включая отрицательный контроль выделения) на дно отдельной пробирки. Визуально проверьте, что все внесенные в пробирки экстракты РНК находятся на дне пробирок. После внесения компонентов накройте штатив крышкой во избежание загрязнения проб.
3. Поставьте контрольные реакции амплификации:
 - а) положительный контроль (К⁺)** – внести 5 мкл ПКО СТ
 - б) отрицательный контроль (К⁻)** – внести 5 мкл DEPC-H₂O
4. В каждую пробирку (содержащую 5 мкл экстракта РНК) внесите на дно **10 мкл Смеси-2**. Визуально проверьте, что Смесь-2 была добавлена во все пробирки.
5. Поместите штатив в инкубатор «NucliSens® EasyQ». Убедитесь, что инкубатор прогрелся до температуры 65 °C и установлена программа:

65 °C – 2 мин

41 °C – 2 мин

hold – 41 °C

Накройте штатив крышкой (**крышку инкубатора не закрывать!**) и инкубируйте по заданной программе.

6. По окончании второго этапа инкубации (2 мин при температуре 41 °С) оставьте пробирки в инкубаторе при температуре 41 °С и внесите на стенки пробирок по 5 мкл раствора ферментов. Аккуратно закройте их.
7. Как можно быстрее (чтобы содержимое пробирок не успело остыть и в течение 5 мин после внесения ферментов) установите пробирки в ротор и закрепите его в приборе. Закройте крышку и запустите программу амплификации (см. приложение 4).
8. По окончании амплификации осторожно сбросьте пробирки в закрывающийся контейнер. Убедитесь, что пробирки не открылись в ходе амплификации.
9. Проведите анализ результатов (см. приложение 4).

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20 - 24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 6 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.

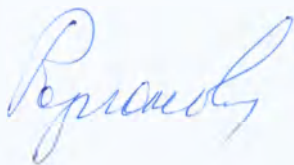
Хранение. Комплекты реагентов «РИБОТЕСТ-сорб» и «РИБОТЕСТ NASBA» хранить при температуре от 2 до 8 °С.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (499) 241-39-22, факс (499) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23) и в адрес

официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 105-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Заведующий НПЛ



Е.Н. Родионова

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВТОМАТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ «NucliSens® easyMAG™».

Порядок работы.

Вариант 1. Выделение нуклеиновых кислот из отделяемого уретры, цервикального канала, влагалища и лизис образца вне прибора.

1. Включить прибор «NucliSens® easyMAG™» и подготовить его к выделению нуклеиновых кислот, следуя инструкции к прибору.
2. В соответствующем окне программного обеспечения прибора заполнить таблицу исследуемых образцов. Ввести для каждого образца следующие параметры:

- Поле Sample ID – задать название образца;
- Поле Request – оставить без изменений;
- Поле Volume – указать **100 мкл**;
- Поле Eluate – указать **55 мкл**;
- Поле Type – отметить **Lysed**;
- Поле Priority – отметить **Normal**;
- Поле Matrix – выбрать **Other**.

Название образца, материал (Matrix) для выделения нуклеиновых кислот - другое (Other), объем образца (volume) – 0,1 мл, объем элюции (Eluate) - 55 мкл, тип образца (Type) – Lysed, очередность выделения РНК/ДНК в образцах (priority) - normal.

3. Создать новый протокол выделения нуклеиновых кислот и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в режиме **Off-board** («Лизис вне прибора»): On-board Lysis Buffer Dispensing-NO, On-board Lysis Incubation-NO).
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. В пробирки, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот в приборе «NucliSens® easyMAG™», внести на стенку по **10 мкл ВКО СТ-rec**. После чего внести по **500 мкл лизирующего буфера**.
6. В каждую пробирку добавить **100 мкл** исследуемого образца отдельным наконечником с аэрозольным барьером, тщательно перемешать пипетированием. В пробирку отрицательного контроля внести **100 мкл транспортной среды для мазков**, тщательно перемешать пипетированием.

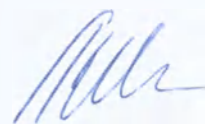
ВНИМАНИЕ! Избегайте попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.

7. Инкубировать в течение 10 мин при комнатной температуре.
8. Ресуспендировать пробирку с магнитной силикой NucliSens, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики**, тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
9. Поместить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения нуклеиновых кислот согласно режиму Off-board  («Лизис вне прибора»).
10. После окончания выделения нуклеиновых кислот, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенные нуклеиновые кислоты. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

Примечание - Во избежание попадания магнитной силики в очищенный раствор нуклеиновых кислот надосадочную жидкость необходимо перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после выделения.

Вариант 2. Выделение нуклеиновых кислот из отделяемого уретры, цервикального канала, влагалища и лизис образца в приборе.

1. Включить прибор «NucliSens® easyMAG™» и подготовить его к выделению нуклеиновых кислот, следуя инструкции к прибору.



2. В соответствующем окне программного обеспечения прибора заполнить таблицу исследуемых образцов. Ввести для каждого образца следующие параметры:
 - Поле Sample ID – задать название образца;
 - Поле Request – оставить без изменений;
 - Поле Volume – указать **100 мкл**;
 - Поле Eluate – указать **55 мкл**;
 - Поле Type – отметить **Primary**;
 - Поле Priority – отметить **Normal**;
 - Поле Matrix – выбрать **Other**.
3. Создать новый протокол выделения нуклеиновых кислот и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в режиме **On-board** («Лизис в приборе»): On-board Lysis Buffer Dispensing-YES, On-board Lysis Incubation-YES).
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. В пробирки, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот в приборе «NucliSens® easyMAG™», внести на стенку по **10 мкл ВКО СТ-rec**.
6. В каждую пробирку добавить **100 мкл** исследуемого образца отдельным наконечником с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля внести **100 мкл транспортной среды для мазков**.

ВНИМАНИЕ! Избегайте попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.

7. Поместить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения нуклеиновых кислот согласно режиму On-board  («Лизис в приборе»).

8. По окончании инкубации ресуспендировать пробирку с магнитной силикой NucliSens, интенсивно перемешав ее содержимое на вортексе. Открыть крышку прибора и в каждую пробирку с образцом внести отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики**, тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.

9. Закрыть крышку прибора и продолжить выделение нуклеиновых кислот нажав .
10. После окончания выделения нуклеиновых кислот, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенные нуклеиновые кислоты. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

Примечание - Во избежание попадания магнитной силики в очищенный раствор нуклеиновых кислот надосадочную жидкость необходимо перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после выделения.

Вариант 3. Выделение нуклеиновых кислот из первой порции мочи и лизис образца в приборе.

1. Включить прибор «NucliSens® easyMAG™» и подготовить его к выделению нуклеиновых кислот, следуя инструкции к прибору.
2. В соответствующем окне программного обеспечения прибора заполнить таблицу исследуемых образцов. Ввести для каждого образца следующие параметры:
 - Поле Sample ID – задать название образца;
 - Поле Request – оставить без изменений;
 - Поле Volume – указать **1000 мкл**;
 - Поле Eluate – указать **55 мкл**;
 - Поле Type – отметить **Primary**;
 - Поле Priority – отметить **Normal**;
 - Поле Matrix – выбрать **Other**.



3. Создать новый протокол выделения нуклеиновых кислот и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в режиме **On-board** («Лизис в приборе»): On-board Lysis Buffer Dispensing-YES, On-board Lysis Incubation-YES).
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. В пробирки, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот в приборе «NucliSens® easyMAG™», внести на стенку по **10 мкл ВКО СТ-rec**.
6. В каждую пробирку добавить **1000 мкл** исследуемой мочи отдельным наконечником с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля внести **1000 мкл транспортной среды для мазков**.
7. Поместить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения нуклеиновых кислот согласно режиму On-board  («Лизис в приборе»).
8. По окончании инкубации ресуспендировать пробирку с магнитной силикой NucliSens, интенсивно перемешав ее содержимое на вортексе. Открыть крышку прибора и в каждую пробирку с образцом внести отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики**, тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
9. Закрыть крышку прибора и продолжить выделение нуклеиновых кислот нажав .
10. После окончания выделения нуклеиновых кислот, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенные нуклеиновые кислоты. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

Примечание - Во избежание попадания магнитной силики в очищенный раствор нуклеиновых кислот надосадочную жидкость необходимо перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после выделения.

Mu

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ. АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «NucliSens® EasyQ» («bioMérieux», Франция).

1. Ввод данных образца.

Шаг	Действие
1	Откройте на компьютере рабочий журнал для ввода образцов (NucliSens EasyQ Sample Login). Результат: Откроется окно Excel, содержащее 6 листов.
2	Выберите лист, содержащий количество образцов, которые вы хотите ввести. Результат: Появится нужный лист.
3	В желтые поля введите идентификационные номера образцов (Sample ID) и значения объемов (Volume ID). Количество знаков в полях идентификационного номера и объема не должно быть более 8. При заполнении полей объема используйте только целые числа от 0 до 9. Никаких десятичных разделителей быть не должно. Для названия теста пользуйтесь буквами (A-Z, a-z), числами (0-9), пробелом или подчеркиванием.
4	Введите название теста в желтое поле ввода. Название файла теста должно быть уникальным. Файл с таким же именем не должен существовать в директории Runs.
5	Нажмите на листе кнопку «Make NucliSens EasyQ Analyzer Import File». Результат: В окне сообщения появляется имя файла и название директории. Эта информация, введенная в Excel, доступна для программного обеспечения NucliSens Analysis Software. Для закрытия окна сообщений нажмите ОК. Файл импорта сохраняется в указанном месте.
6	Закройте рабочий журнал

Номер образца

Значения объемов

Название теста

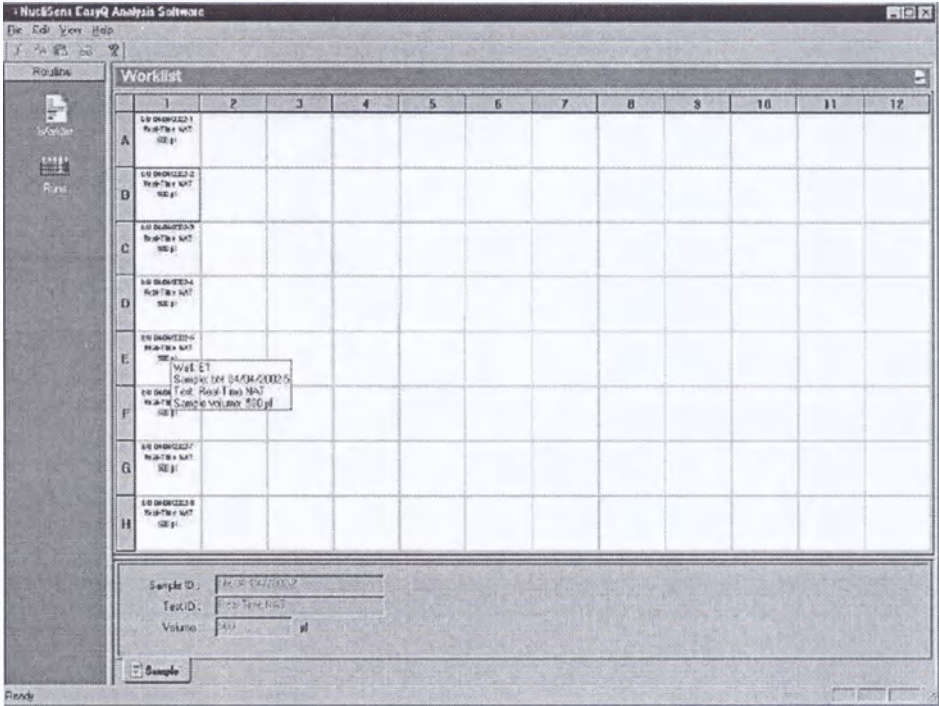
Количество образцов

2. Импорт данных.

Шаг	Действие
-----	----------

Handwritten signature

1	Откройте иконку NucliSens EasyQ Analysis Software.
2	Выберите File > Open (Файл ... открыть)
3	Выберите желаемый файл импорта (в данном случае составленный в предыдущем пункте). Результат: В текстовом окне File name появится имя файла.
4	Нажать Open. Результат: На экране появятся импортированные данные.



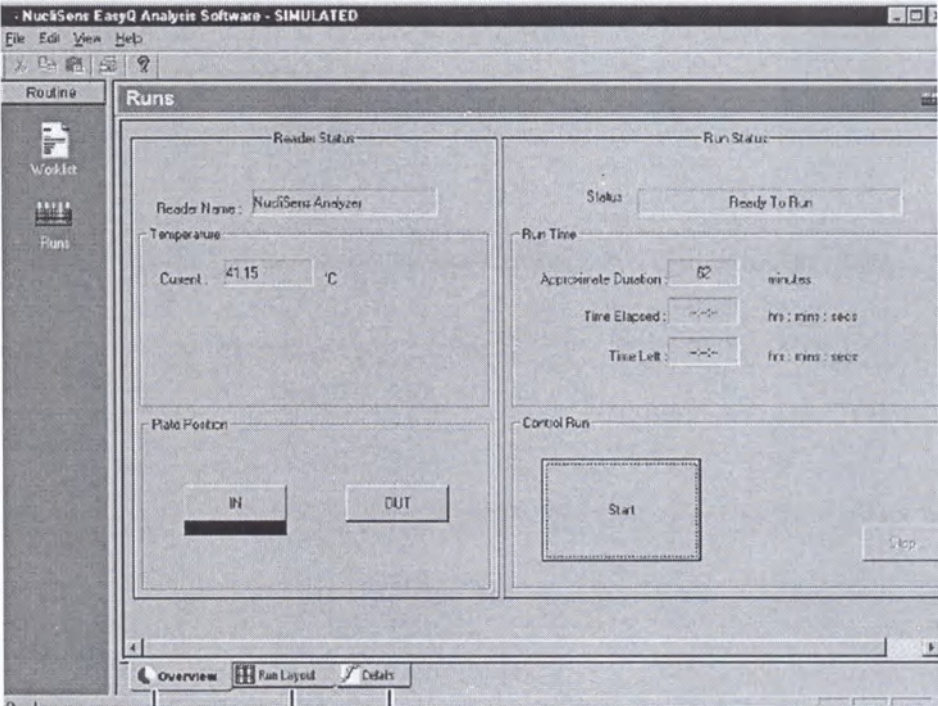
3. **Выполнение теста.**

Перейдите к задаче Runs, которая включает в себя:

- Overview (обзор)
- Run layout (формат теста)
- Details (подробности)

Выбором меню Edit и последующим выбором подменю Measurement Parameters установите длительность теста равную 90 мин.



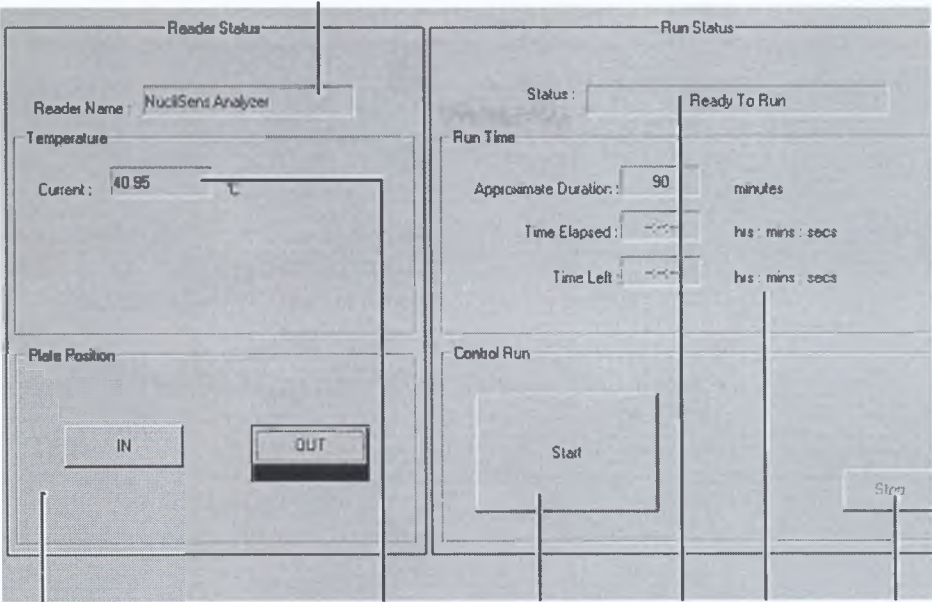


До начала процедуры амплификации проведите следующие проверки:

Шаг	Действие	Где проверять	Обозначения
1	Проверьте, подготовлены ли пробирки и находятся ли они в непосредственной близости	Лаборатория	
2	Правильно ли записаны в программу значения объемов	Клавиша формат теста (Run Layout)	
3	Проверьте положение образцов на плате	Клавиша формат теста (Run Layout)	
4	Проверьте подключение анализатора и готовность его к работе	Клавиша Обзор (Overview)	Состояние и название анализатора
5	Удостоверьтесь, что температура в измерительной камере достигла 41°C	Клавиша Обзор (Overview)	Температура платы носителя
6	Удостоверьтесь, что длительность теста установлена правильно. Если это не так, скорректируйте это значение с помощью меню параметров Edit > Measurement Parameters	Клавиша Обзор (Overview)	Длительность теста

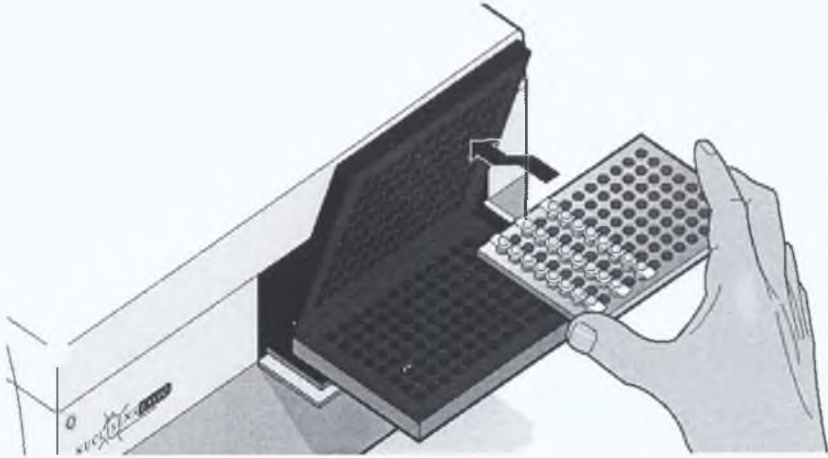
Состояние и название анализатора

Длительность теста



ЗАПУСК ПРИБОРА.

Далее (после завершения инкубации).

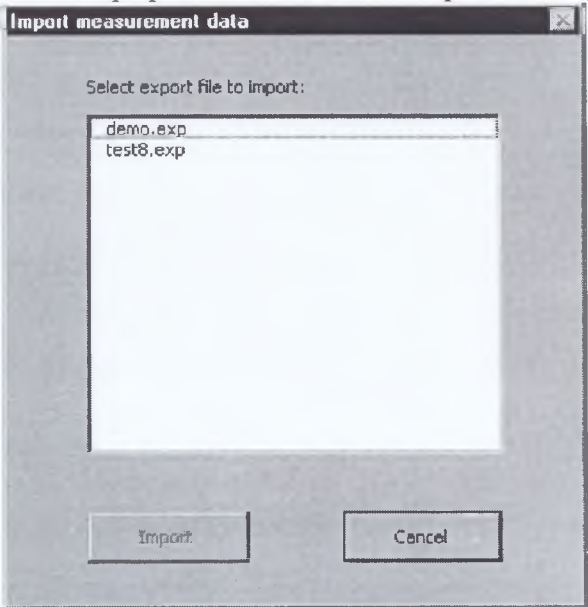
Шаг	Действие
1	Выберете задачу Runs
2	Если плата-носитель находилась внутри прибора, нажмите кнопку «Out»
3	Откройте крышку платы носителя и поставьте на нее поддон с пробирками 
	Удостоверьтесь в том, что пробирки плотно сидят в гнездах, а поддон правильно позиционирован внутри платы носителя, причем пробирки должны быть расположены равномерно
4	Закройте крышку платы носителя и нажмите «In» в подменю Overview
5	Нажмите Start для запуска теста.

В ходе выполнения теста вы можете следить за его ходом в подменю Обзор (Overview). Характеристики экспериментальных кривых можно наблюдать в подменю Подробности (Details).

По окончании теста автоматически генерируется файл результатов измерений. Он записывается в директорию /Results с расширением «.exp». Эти необработанные данные в дальнейшем можно обработать в соответствии с программой в рабочем журнале анализатора.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Импорт данных.

Шаг	Действие
1	Выберете рабочий журнал NucliSens EasyQ Data Analyzer. Появится диалоговое окно с запросом, желаете ли вы воспользоваться макросами. Нажмите кнопку Enable Macro`s (Включить макросы). Результат: Откроется Excel с рабочим журналом NucliSens EasyQ Data Analyzer
2	В окне графического листа выберите задачу Import (импорт) 
3	Результат: Появится диалоговое окно импорта измеренных данных
4	Выберите файл для импорта Нажмите Import Результат: В окне графического листа появляется кнопка Print, и на экране высвечиваются рассчитанные необработанные данные. Результаты автоматически запоминаются
5	В окне графического листа введите порог определения: Threshold WT – 1.180 , Threshold SC – 1.110 после чего нажмите Enter (Ввод). Значения Threshold могут отличаться для разных серий наборов реагентов, поэтому при введении Threshold всегда следуйте инструкции к набору реагентов данной серии! Помните, что программа воспринимает точку как десятичный разделитель! Результат: Данные немедленно пересчитываются и выводятся на экран.
6	Выберите лист General sheet и введите имя оператора в желтое поле ввода. Длина имени должна быть не более 8 символов
7	Выберите Graphic sheet и нажмите кнопку Print в окне графического листа.
8	Выберите File > Save As..>, выберите директорию и имя файла, после чего выберите > Save (сохранить)
9	Закройте рабочий журнал the NucliSens EasyQ Data Analyzer

4. Выключение системы

Если анализатор в течение 3 мин не получает команд, он автоматически переключается

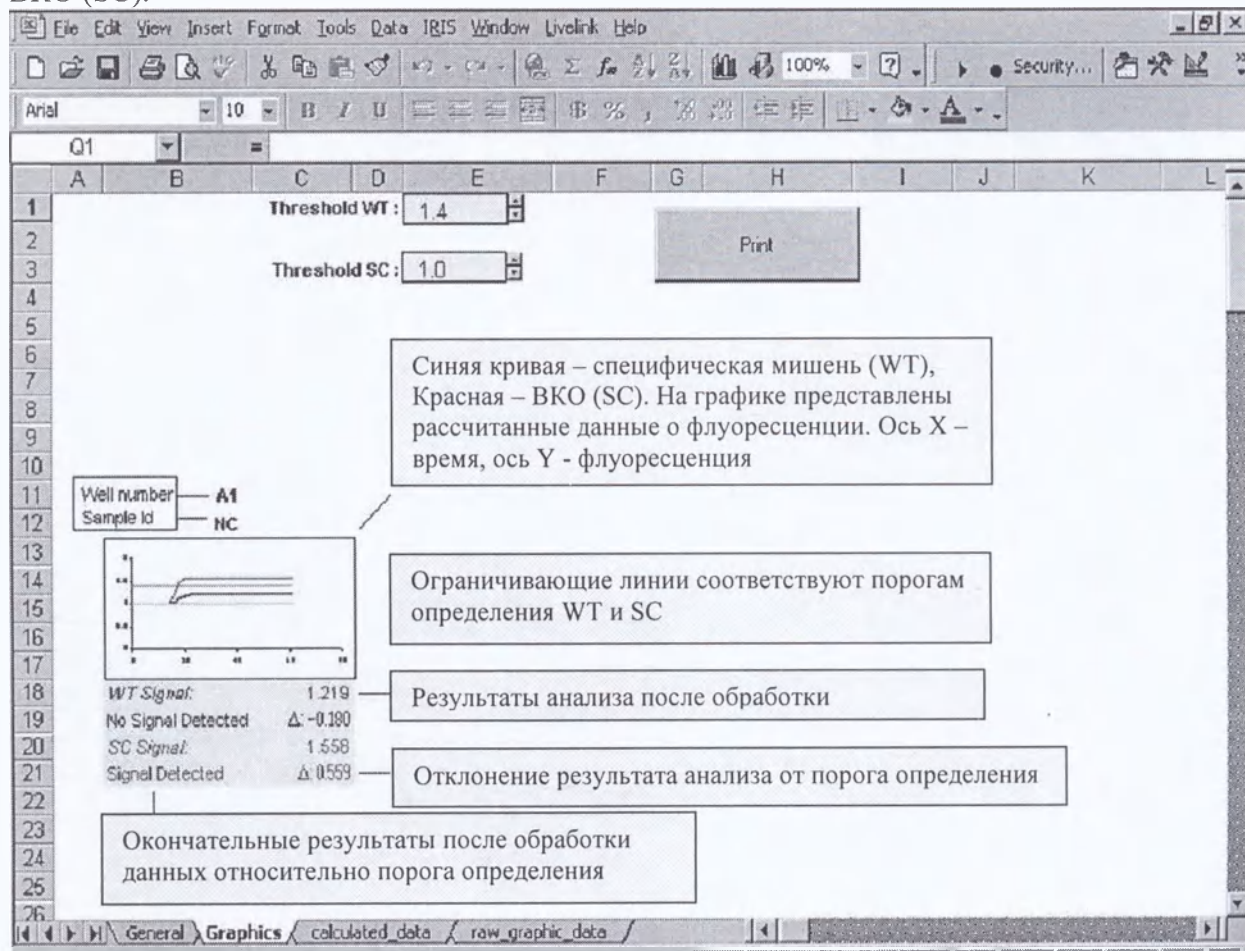


в дежурный режим. При этом лампа гаснет, но температура платы-носителя поддерживается на уровне, предусмотренном по умолчанию. Рекомендуется выключать систему в конце каждого рабочего дня, а также по окончании всех тестов. Для выключения анализатора выполните следующие действия.

Шаг	Действие
1	Выдвиньте плату-носитель
2	Удалите из платы-носителя все оставшиеся пробирки. Для удаления поддона воспользуйтесь предназначенным для этой цели инструментом.
3	Если плата-носитель выдвинута, задвиньте ее
4	Закройте приложение
5	Отключите питание анализатора выключателем, расположенным на левой стороне прибора
6	Отключите питание ПК
7	Накройте Анализатор чехлом

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

После импорта измеренных данных в NucliSens EasyQ Data Analyzer необходимо ввести пороговые значения (Threshold – желтые поля) для специфической мишени (WT) и ВКО (SC).



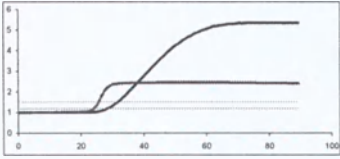
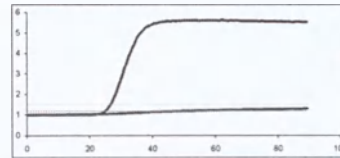
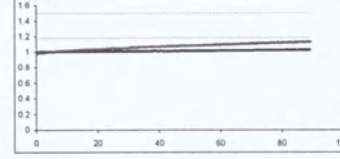
Положительный и отрицательный результаты.

Если величины флуоресценции выше пороговых значений (в строке отклонения результата анализа отображается как **Signal Detected**), результат интерпретируется как положительный. Порог определения определяется как уровень флуоресценции на границе

положительного и отрицательного результата. Если величины флуоресценции ниже порога определения (в строке отклонения результата анализа отображается как **No Signal Detected**) результат интерпретируется как отрицательный. Порог определения был установлен при анализе выборки отрицательных образцов.

Таблица 1.

Оценка результатов анализа

Графическое отображение	WT сигнал	SC сигнал	Результат
 WT Signal: 5.339 Signal Detected Δ: 4.159 SC Signal: 2.406 Signal Detected Δ: 0.907	+	+	Положительный
 WT Signal: 5.518 Signal Detected Δ: 4.338 SC Signal: 1.297 No Signal Detected Δ: -0.203	+	-	Положительный
 WT Signal: 1.048 No Signal Detected Δ: -0.131 SC Signal: 2.355 Signal Detected Δ: 0.855	-	+	Отрицательный
 WT Signal: 1.024 No Signal Detected Δ: -0.155 SC Signal: 1.131 No Signal Detected Δ: -0.369	-	-	Недействительный

Результаты не подлежат учету:

1. Если величина сигнала флуоресценции WT клинического образца ниже порога определения (**No Signal Detected**), и контрольное значение SC ниже порога определения (**No Signal Detected**) результат признается недействительным. Тест для такого образца необходимо повторить (начиная с этапа выделения РНК).
2. Если выдается сообщение об ошибке прибора, результат также признается



недействительным. В этом случае, повторите тест с этапа амплификации РНК.

Контрольные образцы:

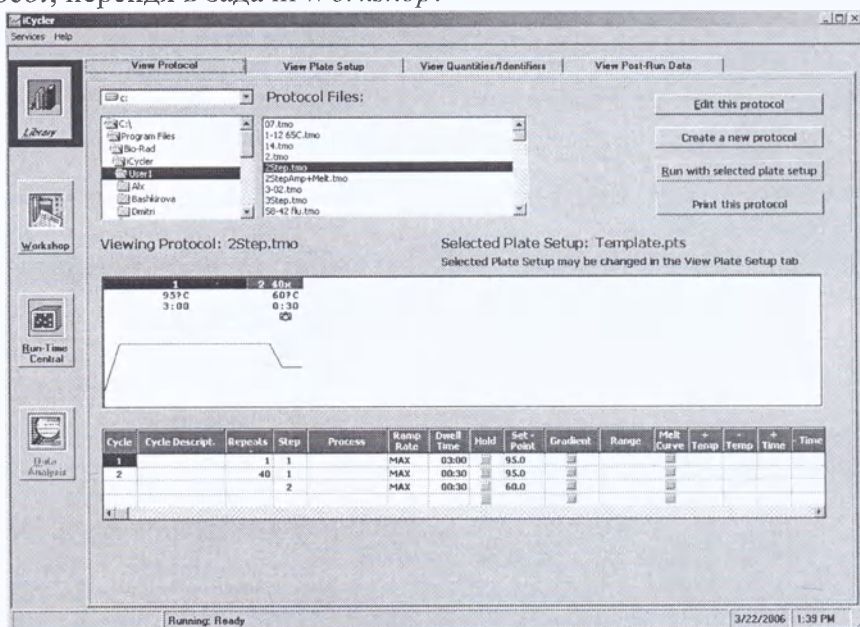
Отсутствие сигнала по каналу SC как в клинических образцах, так и в отрицательном контроле выделения (ОК), а также, отсутствие сигнала по каналу WT в положительном контроле выделения (ПК) могут быть вызваны:

- несоблюдением необходимых условий работы с РНК;
- неэффективной пробоподготовкой;
- разрушением препарата ВКО СТ-рес (ПКО СТ) и/или СТ-Mix в результате истечения срока годности или несоблюдения условий хранения;
- неисправностью прибора.

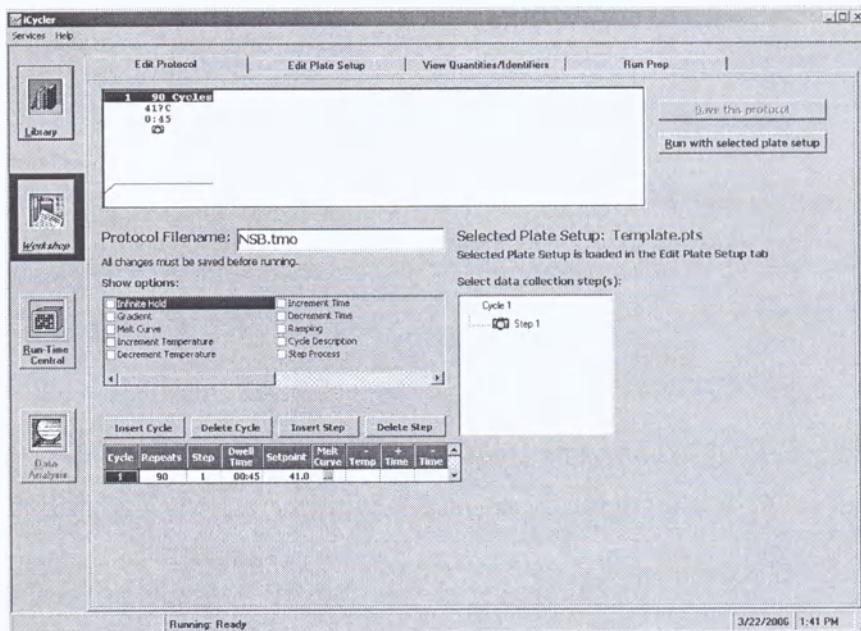


ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ. АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «iQ iCycler» или «iQ5» («BioRad», США).

1. Запрограммируйте прибор для выполнения программы «41-90» нажав клавишу *Create a new protocol*, перейдя в задачи *Workshop*.

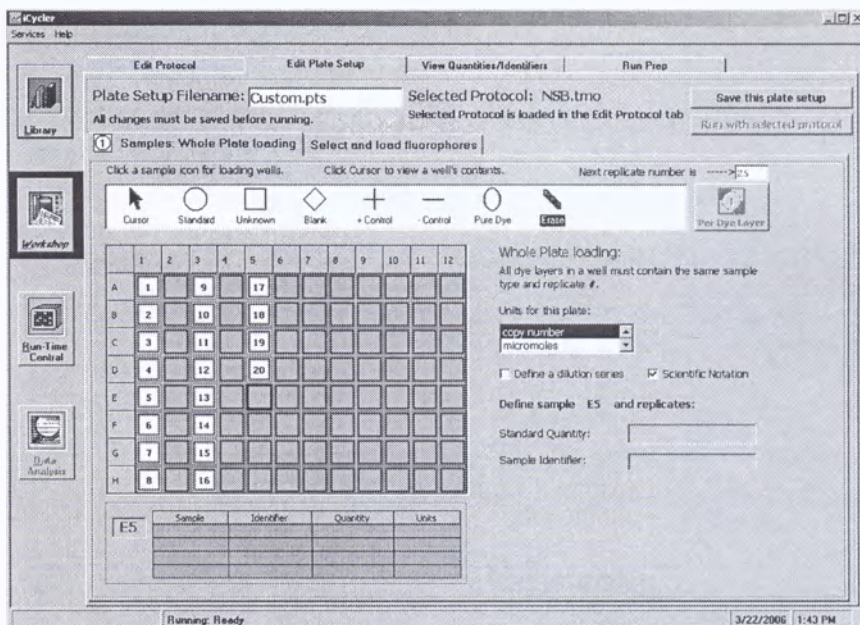


2. В меню *Edit Protocol* запрограммируйте прибор с помощью вспомогательных клавиш. Программа амплификации «41-90»:
90 циклов: 41 °C – 45 с, детекция флуоресценции на первом цикле первого шага.

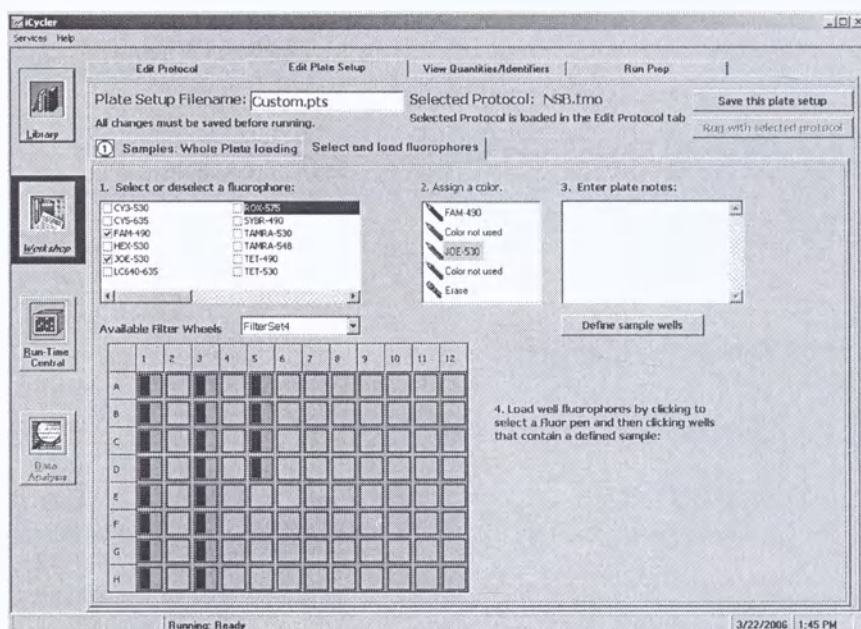


3. В меню *Edit Plate Setup* подменю *Samples* задайте расположение образцов и их идентификацию.

Mr



4. В подменю *Select and load fluorophores* задать измерение флуоресцентного сигнала во всех пробирках по каналам FAM и ROX. Сохранить установки.



Для прибора «iQ5» для создания схемы планшета в окне *Selected Plate Setup* модуля *Workshop* нажать кнопку *Create New* или *Edit Plate Setup*. Редактировать схему планшета в режиме *Whole Plate loading*. Для того чтобы включить второй флуорофор, использовать пиктограмму  над схемой. Задать объем реакции (*Sample Volume*) 20 мкл, тип крышек (*Seal Type*): *Domed Cap*, тип пробирок (*Vessel Type*): *Tubes*. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку *Save & Exit Plate Editing*. **Необходимо провести калибровку прибора под заданные параметры объема и типа пробирок!**

ВНИМАНИЕ! Процедура постановки реакции NASBA на приборе «iQ iCycler» требует использования внешнего планшета для измерения факторов лунок, который устанавливается в прибор до реакционных пробирок. Процедуру считывания факторов лунок необходимо проводить до внесения нуклеиновых кислот в стрипованные пробирки.

Перед запуском выполнения программы в окне *Run Prep* модуля *Workshop* следует



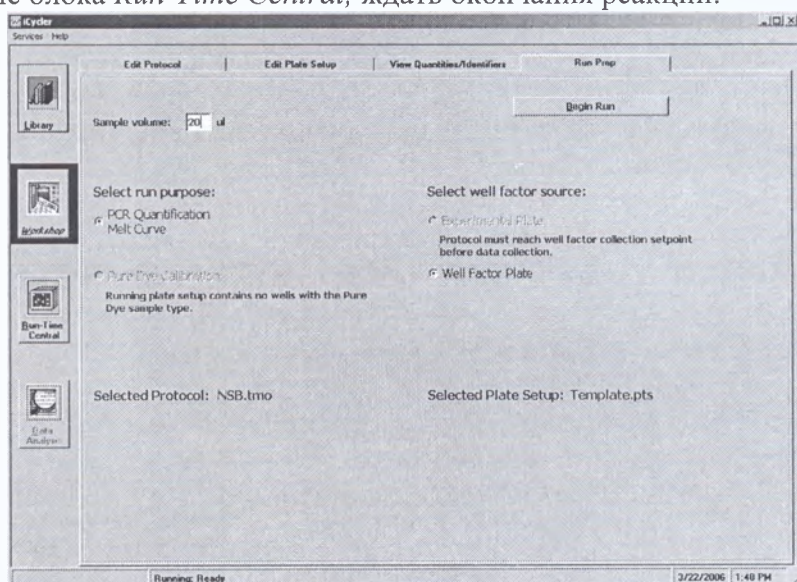
проверить правильность выбранного имени протокола и имени схемы планшета. Задать объем реакционной смеси – 20 мкл.

В окне запуска выполнения программы модуля *Run-Time Central* будет автоматически задано использование внешнего планшета для измерения факторов лунок – под строкой *Select well factor source* будет отмечен вариант *Well Factor Plate*.

После выполнения процедуры считывания факторов лунок, когда прибор перейдет в режим паузы при температуре 60 °С, нужно вынуть пробирки с раствором для определения факторов лунок, нажать кнопку *Continue Running Protocol* в окне блока *Run-Time Central* и ждать пока температура блока не достигнет 41 °С.

Для прибора «iQ5» внешний планшет не используется. Перед запуском выполнения программы анализа следует проверить правильность выбранного протокола (*Selected Protocol*) и схемы планшета (*Selected Plate Setup*). Для запуска нажать кнопку **Run**. Выбрать для измерения факторов лунок вариант *Use Persistent Well Factors* (предлагается по умолчанию).

После того, как температура реакционного блока достигнет 41 °С, нажать кнопку **Pause**, открыть крышку и поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора и нажать кнопку **Continue Running Protocol (Resume Run)** для модели «iQ5» в окне блока *Run-Time Central*, ждать окончания реакции.



УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные данные интерпретируются с помощью программного обеспечения прибора «iQ iCycler» или «iQ5» по наличию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов). Накопление продукта амплификации участка РНК *Chlamydia trachomatis* детектируется по каналу FAM, накопление продукта амплификации ВКО СТ-гес - по каналу ROX.

1. Выбрать в окне модуля *PCR Quantification* данные по каналу FAM (для «iQ iCycler» выбрать значок канала FAM-490 в окне *Select a Reporter*). При этом должен быть выбран режим анализа данных *PCR Base Line Subtracted Curve Fit* (выбирается по умолчанию). Задать уровень пороговой линии на уровне, соответствующем 10-20 % от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. (Уровень флуоресценции ПКО считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для образца ПКО показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

Можно использовать автоматически выбираемый уровень пороговой линии (по умолчанию), если он попадает в указанный диапазон.
Чтобы выделить график образца ПКО (или другого желаемого образца) можно воспользоваться кнопкой *Display Wells*, либо установить курсор на графике этого образца и сделать двойной щелчок.

- Для модели «iQ5» чтобы установить уровень пороговой линии нужно либо перетащить его с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать меню *Baseline Threshold* (в ниспадающем меню, вызываемом щелчком правой кнопки мыши по окну графиков флуоресценции), затем выбрать опцию *User Defined* и ввести нужное значение в текстовом поле *Threshold Position*. Чтобы вывести на экран таблицу результатов, нажать кнопку **Results**.
- Для модели «iQ iCycler» чтобы изменить уровень пороговой линии нужно либо перетащить его с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать опцию *User Defined*, ввести значение в текстовом поле *Threshold Position* и нажать кнопку **Recalculate Threshold Cycles**.

Примечание - Выбранный уровень порога можно использовать и при учете результатов амплификации РНК *Chlamydia trachomatis* при последующих анализах с помощью данного набора, при условии, что не производилась новая калибровка прибора.

2. Анализ результатов амплификации РНК ВКО СТ-рес, детектируемых по каналу ROX. Выполнить аналогичную операцию для данных канала **ROX** (для «iQ iCycler» выбрать значок канала ROX-575 в окне *Select a Reporter*). При этом должен быть выбран режим анализа данных *PCR Base Line Subtracted Curve Fit* (выбирается по умолчанию). Задать уровень пороговой линии на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца ОК (отрицательный контрольный образец выделения) в последнем цикле амплификации. При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для образца ОК показывал характерное (экспоненциальное) нарастание флуоресцентного сигнала. Можно использовать автоматически выбираемый уровень пороговой линии (по умолчанию), если он попадает в указанный диапазон.

Примечание - Выбранный уровень порога можно использовать и при учете результатов амплификации РНК ВКО СТ-рес при последующих анализах с помощью данного набора, при условии, что не производилась новая калибровка прибора.

Положительный и отрицательный результаты.

Если величины флуоресценции выше порога определения (в таблице результатов пороговых циклов для них определено значение «Ct»), результат интерпретируется как положительный. Если величины флуоресценции ниже порога определения (в таблице результатов пороговых циклов для них не определено значение «Ct»), результат интерпретируется как отрицательный.

Порог определения был установлен при анализе выборки отрицательных образцов.

Таблица 2.

Оценка результатов анализа

Канал FAM	Канал ROX	Результат
+	+	Положительный
+	-	Положительный
-	+	Отрицательный
-	-	Недействительный

Результаты не подлежат учету:

Если величина флуоресценции по каналу FAM клинического образца ниже порога определения (**не пересекает** пороговую линию), и контрольное значение по каналу ROX ниже порога определения (**не пересекает** пороговую линию) результат признается

недействительным. Тест для такого образца необходимо повторить (начиная с этапа выделения РНК).

Контрольные образцы.

Отсутствие сигнала по каналу ROX как в клинических образцах, так и в отрицательном контроле выделения (ОК), а также, отсутствие сигнала по каналу FAM в положительном контроле выделения (ПК) могут быть вызваны:

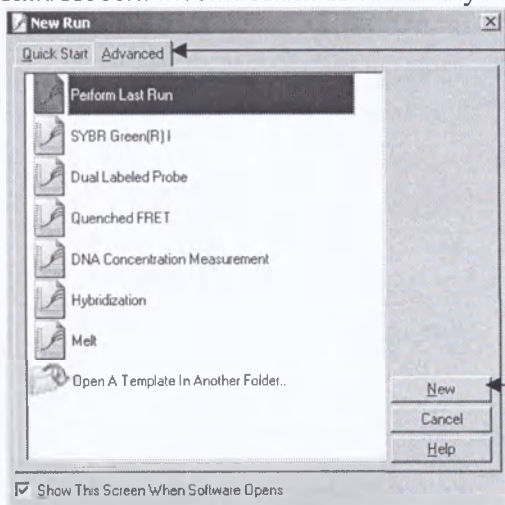
- несоблюдением необходимых условий работы с РНК;
- неэффективной пробоподготовкой;
- разрушением препарата ВКО СТ-rec (ПКО СТ) и/или СТ-Mix в результате истечения срока годности или несоблюдения условий хранения;
- неисправностью прибора.



ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ. АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия).

Далее по тексту термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: для прибора «Rotor-Gene» 3000 / для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 / для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000.

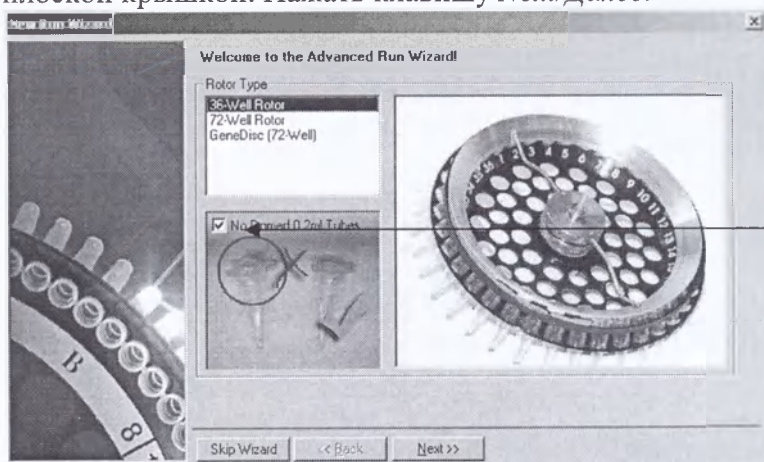
1. Запрограммировать прибор для выполнения программы «41-90». При этом следует выбрать режим программирования *Advanced/Детальный мастер* в окне *New Run/Новый тест*. Нажать клавишу *New/Новый*.



Режим *Advanced/Детальный мастер*

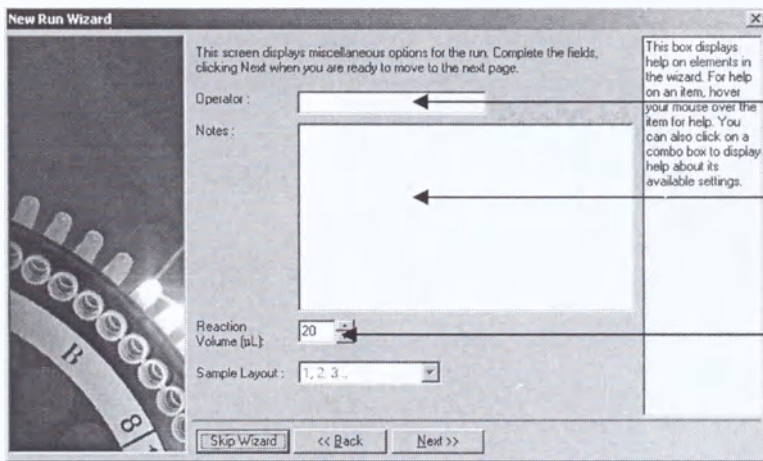
Клавиша *New/Новый*

2. В следующем окне пометить бокс удостоверяющий, что вы используете пробирки с плоской крышкой. Нажать клавишу *Next/Далее*.



Отметить галочкой

3. В следующем окне введите имя оператора. Если это необходимо, какие-либо замечания по тесту. А также объем реакционной смеси, который равен 20 мкл. Нажмите клавишу *Next/Далее*.
4. Для прибора «Rotor-Gene» 6000 требуется использовать программу версии 1.7 Build 67 (или аналогичную более позднюю версию). В окне, следующем после окна выбора ротора, необходимо установить объем реакционной смеси *Reaction volume/Объем реакции (μL)* равный **20**. Для «Rotor-Gene» 6000 после этого автоматически будет установлена галочка в боксе *15 μL oil layer volume/15 μL объем масла/воска*, активирующая эту нужную опцию.



Поле для введения имени оператора

Поле для введения комментариев

Объем реакционной смеси

5. Запрограммируйте прибор, нажав клавишу *Edit profile/Редактор профиля*.

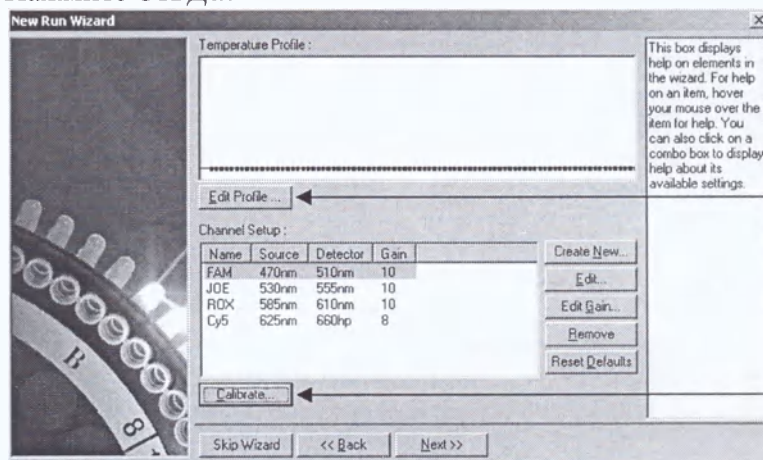
Программа «41-90» для амплификатора «Rotor-Gene» 3000/6000:

41 °C – 1 мин

95 циклов: 41 °C – 40 с

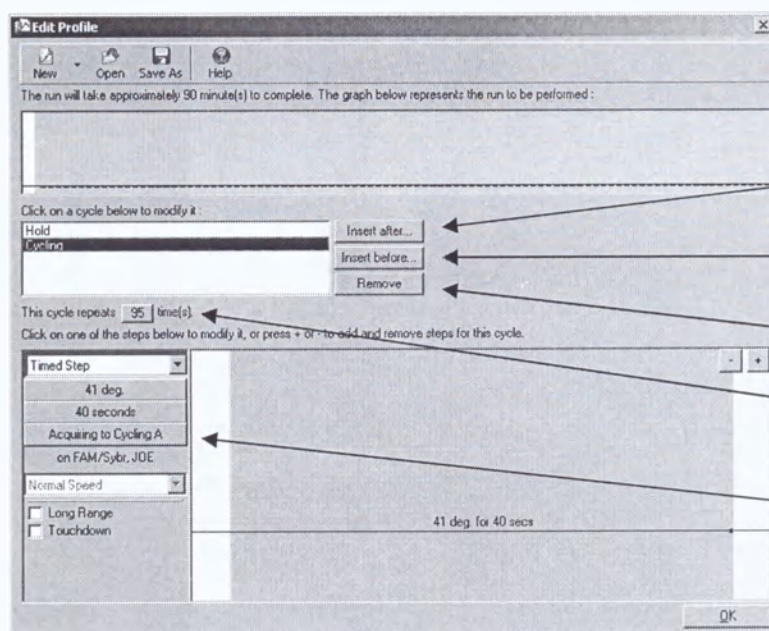
детекция флуоресценции по каналам FAM/Green и ROX/Orange.

6. Нажмите *OK/Да*.



Изменить профиль

Калибровка



Вставить после...

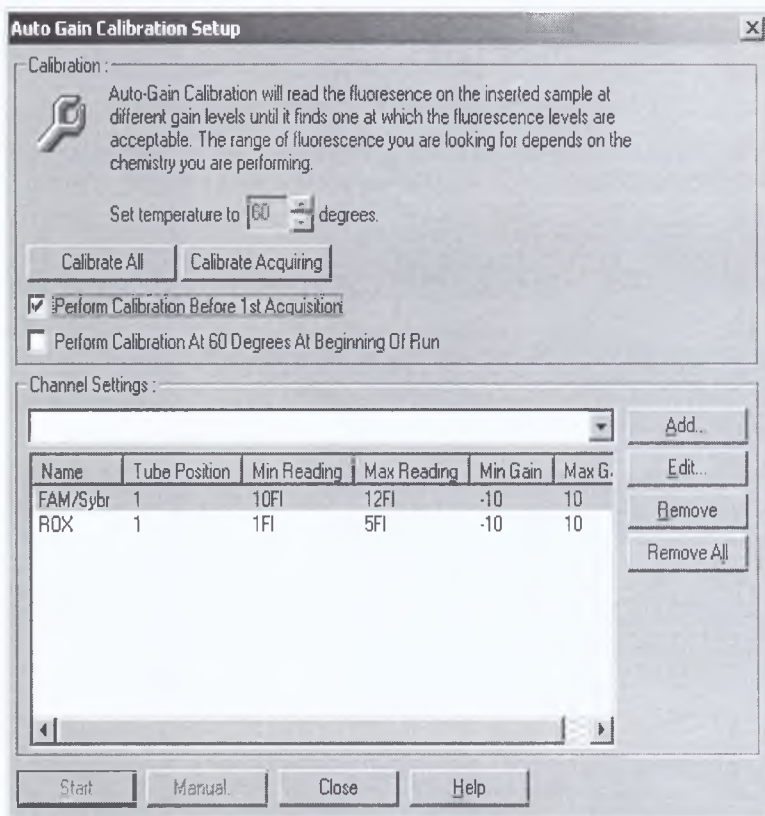
Вставить до...

Удалить

Количество циклов

Установка детекции флуоресценции

7. Задайте автоматическую калибровку для выбора параметра *Gain*/Усиление сигнала. Для этого в окне *Channel Setup* выбрать кнопку *Calibrate/Gain Optimisation.../Onm.уровня сигн.* В открывшемся окне *Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала* нажать кнопку *Calibrate Acquiring/Optimize Acquiring/Onm.* Детек-мых, пометить галочкой бокс в строке *Perform Calibration Before 1st Acquisition» /Perform Optimisation Before 1-st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции.* Для канала FAM/Sybr/Green нужно указать в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение 10, а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение 12. Для канала ROX/Orange нужно указать в графе *Min Reading/Миним. Сигнал* значение 1, а в графе *Max Reading/Максим. Сигнал* значение 5. В графе *Tube position/Позиция Пробирки* следует указать номер любой пробирки с реакционной смесью (не пустой). Закрыть окно *Auto Gain Calibration Setup/Авто-оптимизация уровня сигнала.*



Добавить

Изменить

Удалить

Удалить все

8. После запуска выполнения программы кнопкой **Start Run/Старт** в открывшемся окне таблицы образцов откройте предварительно сохраненную в виде файла таблицу образцов (или отредактируйте последовательность образцов) и нажмите кнопку **Finish/OK**.

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные данные интерпретируются с помощью программного обеспечения прибора «Rotor-Gene» 3000/6000 по наличию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов). Накопление продукта амплификации участка РНК *Chlamydia trachomatis* детектируется по каналу для флуорофора FAM/Green, а накопление продукта амплификации ВКО СТ-рес - по каналу для флуорофора ROX/Orange.

1. Выбрать в главном меню значок меню *Analysis/Анализ*, в ниспадающем меню выбрать вкладку *Quantitation/Количественный*. Выполнить эту операцию для данных канала

FAM/Green, выбрав в поле *Cycling A FAM/Cycling A Green*, затем для данных канала ROX/Orange, выбрав в поле *Cycling A ROX/Cycling A Orange*.

2. Щелкнув кнопкой мыши на графике нормализованных кривых флуоресценции по каналу FAM/Green нажать в меню над графиком кнопку *Dynamic tube/Динамич.фон*, затем кнопку *More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов* и ввести в текстовом поле значение **5** (5 %). Задать уровень пороговой линии, введя в текстовом поле *Threshold/Порог* значение **0,05** (под таблицей образцов). Внизу под графиком появится таблица результатов с указанием значения порогового цикла по каналу FAM/Green для каждого образца (*Quant. Results – Cycling A. FAM/Quant. Results – Cycling A. Green*).
3. Щелкнув кнопкой мыши на графике нормализованных кривых флуоресценции по каналу ROX/Orange нажать в меню над графиком кнопку *Dynamic tube/Динамич.фон*, затем кнопку *More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов* и ввести в текстовом поле значение **5** (5 %). Задать уровень пороговой линии в текстовом поле *Threshold/Порог* значение **0,05**. Внизу под графиком появится таблица результатов с указанием значения порогового цикла по каналу ROX/Orange для каждого образца (*Quant. Results – Cycling A. ROX/Quant. Results – Cycling A. Green*).

Положительный и отрицательный результаты.

Если величины флуоресценции выше порога определения (в таблице результатов пороговых циклов для них определено значение *Ct*), результат интерпретируется как положительный. Если величины флуоресценции ниже порога определения (в таблице результатов пороговых циклов для них не определено значение *Ct*), результат интерпретируется как отрицательный.

Порог определения был установлен при анализе выборки отрицательных образцов.

Таблица 3.

Оценка результатов анализа

Канал FAM (Green)	Канал ROX (Orange)	Результат
+	+	Положительный
+	-	Положительный
-	+	Отрицательный
-	-	Недействительный

Результаты не подлежат учету:

1. Если величина флуоресценции по каналу FAM/Green клинического образца ниже порога определения (**не пересекает** пороговую линию), и контрольное значение по каналу ROX/Orange ниже порога определения (**не пересекает** пороговую линию) результат признается недействительным. Тест для такого образца необходимо повторить (начиная с этапа выделения РНК).

Контрольные образцы.

Отсутствие сигнала по каналу ROX/Orange как в клинических образцах, так и в отрицательном контроле выделения (ОК), а также, отсутствие сигнала по каналу FAM/Green в положительном контроле выделения (ПК) могут быть вызваны:

- несоблюдением необходимых условий работы с РНК;
- неэффективной пробоподготовкой;
- разрушением препарата ВКО СТ-гес (ПКО СТ) и/или СТ-Mix в результате истечения срока годности или несоблюдения условий хранения;
- неисправностью прибора.

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
13.06.07	п. Транспортирование	Изменение условий транспортирования тест-системы: Тест-систему транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение пяти суток. При получении разукomплектовать.
19.09.07	По всему тексту	Изменено наименование «тест-система» на «набор реагентов»
	Приложения 2 и 3	Изменены названия каналов с JOE на ROX.
	Приложение 3	Добавлен прибор «Rotor-Gene» 6000, добавлены названия соответствующие прибору «Rotor-Gene» 6000
14.02.08	---	Добавлены реквизиты инструкции
23.06.09	Колонтитул	Добавлен каталожный номер N-B1
	п. Состав	Изменена масса и количество реагентов: гранула с ферментами 6,5 мг 5 штук на 5 мг 6 штук, гранула с реагентами 10 мг 5 штук на 6,5 мг 6 штук
	По всему тексту	Добавлены формы комплектации
		Добавлены ПКО, ВКО и транспортная среда
	п. Приложение 4	Добавлено выделение с помощью автоматической станции «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция).
	п. Проведение анализа. Этап 1	Увеличено время сушки сорбента после отмывки раствором для отмывки 4 с 10 мин до 15 мин
	п. Этап 2. Проведение реакции амплификации	Уменьшено количество приготавливаемых рабочих растворов реагентов с 12 реакций на 10 реакций.
	п. Проведение амплификации, п. Приложение 2	Добавлен прибор «iQ5»
	п. Форма комплектации, п. Состав	Изменения по тексту
	По всему тексту	Реагент ПКО СТ-рес заменён на ПКО СТ
	п. Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удалена информация о необходимости разукomплектовать набор при получении

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
Национальный орган контроля**
Федеральное государственное учреждение науки
Государственный НИИ стандартизации и контроля
медицинских биологических препаратов им Л.А.Тарасевича

«УТВЕРЖДАЮ»
И.о. директора ГИСК им Л.А.Тарасевича
профессор А.А.Мовсисянц
« 22 » 06 2009 г

ЭКСПЕРТНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

на набор реагентов для выявления рРНК *Chlamydia trachomatis* в клиническом материале методом NASBA в режиме «реального времени» «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ».

производства ФГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия

Номер направительного письма ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора
№ 03/250 от 8.04.09

Дата представления разработчиком документации и образцов препарата на контроль.

Вх. № 1564 от 13.04.09 (проект ТУ, проект Инструкции по применению)

Вх. № 2242 от 25.05.09:

Серия 18.05.09, срок годности 18.11.09.

Серия 20.05.09, срок годности 20.11.09.

Серия 21.05.09, срок годности 21.11.09.

Экспертиза проводилась с целью: возможности внесения изменений в Технические условия и Инструкцию по применению.

Состав набора реагентов, включая вспомогательные вещества.

Комплект «РИБОТЕСТ-сорб» - комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала (для ручной экстракции), включает:

- Лизирующий буфер - прозрачная бесцветная жидкость (возможно образование осадка в виде кристаллов)
- Отмывочный буфер - прозрачная бесцветная жидкость (возможно образование осадка в виде кристаллов);
- Раствор для отмывки 3 - прозрачная бесцветная жидкость;
- Раствор для отмывки 4 - прозрачная бесцветная жидкость;
- Сорбент - суспензия белого цвета;
- РНК-элюент - прозрачная бесцветная жидкость;

Комплект «РИБОТЕСТ NASBA» - комплект реагентов для амплификации РНК *Chl.trachomatis* методом NASBA в режиме «реального времени»:

- Гранулы с ферментами – лиофилизированные сферы, содержащие AMV обратную транскриптазу, РНКазу H, T7 РНК полимеразу, БСА - шарики белого цвета;
- Растворитель фермента – сорбит в водном растворе - прозрачная бесцветная жидкость;
- Гранулы с реагентами – лиофилизированные сферы, содержащие нуклеотиды, дитиотриэтол, и $MgCl_2$ - шарики белого цвета ;
- Растворитель реагентов – прозрачная бесцветная жидкость
- Раствор KCl - прозрачная бесцветная жидкость;
- DEPC- H_2O - прозрачная бесцветная жидкость;
- СТ-Mix – водный раствор, содержащий смесь двух олигонуклеотидных праймеров, смесь двух олигонуклеотидных зондов, натрия азид - прозрачная розовая жидкость.
- ПКО СТ - рекомбинантный положительный контрольный образец. Фрагмент генома *Chlamydia trachomatis* клонирован по сайту EcoRI (GAATTC) в вектор λ gt10.
- ВКО СТ-rec – рекомбинантный внутренний контрольный образец. Фрагмент генома *C.trachomatis* с измененной гибридизационной областью молекулярного маячка клонирован по сайтам KpnI (GGTAC^C) и BamHI (G^GATCC) в плазмиду d8 (вектор pET20-ms2+gag), которая уже содержит фрагмент генома gag HIV (1358-1564, HIVNL43);
- Транспортная среда для мазков

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 60 проб, включая контроли

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли

Один набор реагентов предназначен для проведения 60 тестов, включая контроли.

Форма выпуска.

Набор реагентов / набор диагностический (упаковки комбинированные)

Набор выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБОТЕСТ-сорб» и «РИБОТЕСТ-NASBA». Форма предназначена для ручной экстракции.

Форма 2 включает комплект реагентов «РИБОТЕСТ-NASBA». Форма предназначена для автоматической экстракции.

Форма комплектации 1 предназначена для полного анализа, включая выделение нуклеиновых кислот из клинического материала, амплификации РНК *Chlamydia trachomatis* методом NASBA в режиме «реального времени».

Форма комплектации 2 предназначена для амплификации РНК *Chlamydia trachomatis* методом NASBA в режиме «реального времени». Для полного анализа необходимо дополнительно использовать автоматическую станцию «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция) для выделения РНК из клинического материала.

Результаты технических испытаний:

В основе метода NASBA лежит экспоненциальное накопление одноцепочечных фрагментов РНК за счет конкурентного действия трех ферментов, участвующих в репликации - AMV обратная транскриптаза, РНКазы H, T7 РНК-полимераза с двумя специфическими праймерами в изотермических условиях (при 41 ° C). При амплификации РНК-мишени в этих условиях накапливается множество копий РНК-продукта. При диагностике хламидийной инфекции в качестве мишени используется рибосомальная РНК, количество копий которых может достигать от несколько сотен до несколько десятков тысяч на одну бактериальную клетку. Метод NASBA в режиме «реального времени» основана на использовании флуоресцентно-меченных олигонуклеотидных зондов в составе реакционной смеси и позволяет оценивать накопление специфического продукта амплификации по увеличению уровня флуоресцентного сигнала. Возрастание флуоресценции обусловлено гибридизацией олигонуклеотидного зонда с комплементарным ему участком РНК-мишени.

Ранее набор реагентов «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ» выпускался по ТУ 9398-016-01897593-2006. Настоящие изменения связаны с введением комплекта для выделения на автоматической станции «NucliSens® easyMAG™» и в связи этим введением двух форм комплектации набора реагентов.

В специализированной лаборатории ГИСК им.Л.А.Тарасевича был проведен лабораторный контроль трех серий набора реагентов двух форм комплектации с использованием комплекта для выделения как для ручной экстракции, так и на автоматической станции «NucliSens® easyMAG™» с применением:

- стандартного образца предприятия «СОП ПКО СТ-rec», в концентрациях, 3×10^4 ГЭ/мл в трех повторях, 3×10^3 ГЭ/мл в двух повторях, 3×10^2 ГЭ/мл;
- положительного контрольного образца «ПКО СТ », в концентрации 3×10^3 ГЭ/мл,
- отрицательного контрольного образца (транспортная среда для мазков);

Набор реагентов выявлял рРНК *Chlamydia trachomatis* в «СОП ПКО СТ-rec» и «ПКО СТ » в количестве 3×10^4 ГЭ/мл и 3×10^3 ГЭ/мл и давал отрицательный результат при тестировании отрицательного контрольного образца, что соответствует требованиям проекта ТУ.

Результаты контроля образцов препарата в ГИСК им Л.А.Тарасевича
Серии соответствуют требованиям проекта ТУ (см. приложение).

Заключение и рекомендации.

Проведенные испытания показали что изменения, введенные в состав набора реагентов «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ», тест-система для выявления 16S рРНК *Chlamydia trachomatis* в клиническом материале методом NASBA в режиме «реального времени», и в НД (Технические

условия и Инструкцию по применению) на набор реагентов не повлияли на качество, безопасность и эффективность набора реагентов «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ». Внесенные изменения в НД рекомендуются к согласованию в установленном порядке

Материалы рассмотрены на заседании Ученого совета ГИСК им.Л.А.Тарасевича

от «23» июня 2009г. протокол № 9.

Зав. лабораторией
арбовирусных инфекций,
риккетсиозов и ВИЧ-инфекции
профессор

М.С.Воробьева

ПРОТОКОЛ КОНТРОЛЯ № 1

Наименование набора реагентов для выявления рРНК *Chlamydia trachomatis*, полученной из клинического материала, методом NASBA в режиме «реального времени» «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ»

Серия 18.05.09 срок годности до 18.11.09 форма 1

Изготовитель: ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

Учреждение, приславшее образцы на анализ:

ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

Вид контроля: на соответствие требованиям проекта ТУ 9398-016-01897593-2009

ФГУН "Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А.ТАРАСЕВИЧА"
119002 Москва Г-2, Сивцев-Вражек, 41

Показатели	Требования проекта ТУ	Результаты анализа
Внешний вид	Лизирующий буфер - прозрачная бесцветная жидкость(возможно образование осадка в виде кристаллов);	соответствует
	Отмывочный буфер - прозрачная бесцветная жидкость (возможно образование осадка в виде кристаллов)	соответствует
	Раствор для отмывки 3 - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Раствор для отмывки 4 - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Сорбент - суспензия белого цвета	соответствует
	РНК-элюент - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	ВКО СТ-рес - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Транспортная среда для мазков - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Гранулы с ферментами - шарики белого цвета	соответствует
	Растворитель фермента - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Гранулы с реагентами - шарики белого цвета	соответствует
	Растворитель реагентов - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Раствор KCl - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	DEPC-H ₂ O - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	СТ-Mix - прозрачная розовая жидкость	соответствует
Технические характеристики: чувствительность и специфичность	Чувствительность - величина флуоресценции по каналу WT выше порогового значения (в строке отклонения результата анализа отображается как Signal Detected) в разведениях стандартного образца предприятия № 35 «СОП ПКО СТ-рес», содержащих рРНК <i>C.trachomatis</i> в концентрации не менее 3×10^4 копий/мл	соответствует
	Специфичность Отсутствие флуоресценции по каналу WT. Величина флуоресценции по каналу SC выше порогового значения (в строке отклонения результата анализа отображается как Signal Detected) в «ОК» (отрицательном контрольном образце),	соответствует
Упаковка Маркировка	В соответствии с проектом ТУ	
ВЫВОД: Серия 18.05.09 срок годности 18.11.09 (форма 1) набора реагентов «АмплиСенс® <i>Chlamydia trachomatis</i> -РИБОТЕСТ» соответствует проекту ТУ 9398-016-01897593-2009		

лабораторией
вирусных инфекций
гепатитов и ВИЧ-инфекции

Сарт

М.С.Воробьева

ПРОТОКОЛ КОНТРОЛЯ № 2

Наименование набора реагентов для выявления рРНК *Chlamydia trachomatis*, полученной из клинического материала, методом NASBA в режиме «реального времени» «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ»

Серия 20.05.09 срок годности до 20.11.09 форма 1

Изготовитель: ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

Учреждение, приславшее образцы на анализ:

ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

Вид контроля: на соответствие требованиям проекта ТУ 9398-016-01897593-2009

ФГУН "Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А.ТАРАСЕВИЧА" 119002 Москва Г-2, Сивцев-Вражек. 41

Показатели	Требования проекта ТУ	Результаты анализа
Внешний вид	Лизирующий буфер - прозрачная бесцветная жидкость(возможно образование осадка в виде кристаллов);	соответствует
	Отмывочный буфер - прозрачная бесцветная жидкость (возможно образование осадка в виде кристаллов)	соответствует
	Раствор для отмывки 3 - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Раствор для отмывки 4 - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Сорбент – суспензия белого цвета	соответствует
	РНК-элюент - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	ВКО СТ-гес – прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Транспортная среда для мазков - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Гранулы с ферментами – шарики белого цвета	соответствует
	Растворитель фермента – прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Гранулы с реагентами - шарики белого цвета	соответствует
	Растворитель реагентов - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Раствор KCl - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	DEPC-H ₂ O - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	СТ-Mix – прозрачная розовая жидкость	соответствует
	ПКО СТ - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Технические характеристики: чувствительность и специфичность	Чувствительность - величина флуоресценции по каналу WT выше порогового значения (в строке отклонения результата анализа отображается как Signal Detected) в разведениях стандартного образца предприятия № 35 «СОП ПКО СТ-гес», содержащих рРНК <i>C.trachomatis</i> в концентрации не менее 3×10 ⁴ копий/мл	соответствует
	Специфичность Отсутствие флуоресценции по каналу WT. Величина флуоресценции по каналу SC выше порогового значения (в строке отклонения результата анализа отображается как Signal Detected) в «ОК» (отрицательном контрольном образце),	соответствует
Упаковка Маркировка	В соответствии с проектом ТУ	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Серия 20.05.09 срок годности 20.11.09 (форма 1) набора реагентов «АмплиСенс® <i>Chlamydia trachomatis</i> -РИБОТЕСТ» соответствует проекту ТУ 9398-016-01897593-2009		

лабораторией
вирусных инфекций
гепатитов и ВИЧ-инфекции

Серия

М.С.Воробьева

ПРОТОКОЛ КОНТРОЛЯ № 3

Наименование набора реагентов для выявления рРНК *Chlamydia trachomatis*, полученной из клинического материала, методом NASBA в режиме «реального времени» «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ»

Серия: 21.05.09 срок годности до 21.11.09 форма 1

Изготовитель: ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

Учреждение, приславшее образцы на анализ:

ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

Вид контроля: на соответствие требованиям проекта ТУ 9398-016-01897593-2009

ФГУН "Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А.ТАРАСЕВИЧА"
119002 Москва Г-2, Сивцев-Вражек, 41

Показатели	Требования проекта ТУ	Результаты анализа
Внешний вид	Лизирующий буфер - прозрачная бесцветная жидкость(возможно образование осадка в виде кристаллов);	соответствует
	Отмывочный буфер - прозрачная бесцветная жидкость (возможно образование осадка в виде кристаллов)	соответствует
	Раствор для отмывки 3 - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Раствор для отмывки 4 - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Сорбент – суспензия белого цвета	соответствует
	РНК-элюент - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	ВКО СТ-гес – прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Транспортная среда для мазков - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Гранулы с ферментами – шарики белого цвета	соответствует
	Растворитель фермента – прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Гранулы с реагентами - шарики белого цвета	соответствует
	Растворитель реагентов - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	Раствор KCl - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	DEPC-H ₂ O - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
	СТ-Mix – прозрачная розовая жидкость	соответствует
	ПКО СТ - прозрачная бесцветная жидкость	соответствует
Технические характеристики: чувствительность и специфичность	Чувствительность - величина флуоресценции по каналу WT выше порогового значения (в строке отклонения результата анализа отображается как Signal Detected) в разведениях стандартного образца предприятия № 35 «СОП ПКО СТ-гес», содержащих рРНК <i>C.trachomatis</i> в концентрации не менее 3×10 ⁴ копий/мл	соответствует
	Специфичность Отсутствие флуоресценции по каналу WT. Величина флуоресценции по каналу SC выше порогового значения (в строке отклонения результата анализа отображается как Signal Detected) в «ОК» (отрицательном контрольном образце),	соответствует
Упаковка Маркировка	В соответствии с проектом ТУ	

АКЛЮЧЕНИЕ: Серия 21.05.09 срок годности 21.11.09 (форма 1) набора реагентов АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ» соответствует проекту ТУ 9398-016-1897593-2009

лабораторией
вирусных инфекций
сифилиса и ВИЧ-инфекции

Сирин

М.С.Воробьева