

Приказом Росздравнадзора
от _____ № _____

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

В.И.Покровский
_____ 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*

сероваров (типов) А, В и С в клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-А, В, С-FL»

АмплиСенс®



Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	8
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА...	9
ФОРМАТ FER.....	10
СОСТАВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ.....	13
А. Подготовка пробирок для амплификации	13
Б. Проведение амплификации	16
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	17
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	18
ФОРМАТ FRT.....	20
СОСТАВ	20
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	22
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	22
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	23
А. Подготовка пробирок для амплификации	23
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	26
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	27
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	30
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	31

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-A, B, C-FL» предназначен для выявления ДНК возбудителя трахомы *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В и С путем амплификации специфического фрагмента ДНК данного микроорганизма методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные путем экстракции ДНК из отделяемого конъюнктивы (мазков с конъюнктивы).

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT), либо после ее завершения (формат FEP). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участков ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В

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

составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. К олигонуклеотидным зондам, специфичным к различным ДНК-мишеням, прикреплены различные флуоресцентные метки. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации каждой ДНК-мишени путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по соответствующему каналу. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании формата FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании формата FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в двух форматах.

Формат FEP

Набор реагентов выпускается в 6 формах комплектации:

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

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

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 L.

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

Форма 5 включает комплект реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» и комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 L.

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

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения амплификации фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 4 и 5 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего взятие клинического материала, экстракцию из него ДНК и амплификацию ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке».

Форма комплектации 6 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Использование формы комплектации 6 производится только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 6 формах комплектации:

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

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

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 L.

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

Форма 5 включает комплект реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» и комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 L.

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

Формы комплектации 1, 2 и 3 предназначены для проведения амплификации фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Формы комплектации 4 и 5 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего взятие клинического материала, экстракцию из него ДНК и амплификацию фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Форма комплектации 6 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Использование формы комплектации 6 производится только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ²
Отделяемое конъюнктивы	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	1x10 ³
Отделяемое конъюнктивы	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»	«ЭДЭМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	5x10 ³

Аналитическая специфичность

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и панели образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Chlamydia trachomatis* серовар E; *Chlamydia trachomatis* LGV биовар; *Staphylococcus* spp.; *Streptococcus* spp.; *Neisseria gonorrhoeae*; *Neisseria* spp.; HSV 1 и 2 типа; *Candida albicans*; *Mycoplasma hominis*; *Ureaplasma urealyticum*; *Ureaplasma parvum*; *Mycoplasma genitalium*; *Trichomonas vaginalis*; *Treponema pallidum*; *Toxoplasma gondii*; *Escherichia coli*; *Gardnerella vaginalis*; *Lactobacillus* spp.; CMV; HPV.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

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

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации и детекции (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ТУ 9398-098-01897593-2009) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1-3 (формат FEP и формат FRT) и использовании набора реагентов «ДНК-сорб-АМ».
2. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ», включающий контроли (ТУ 9398-036-01897593-2009), или «ЭДЭМ» (ТУ 9398-158-01897593-2010) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 1-3 (формат FEP и формат FRT).
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-100 F, вариант FEP-100 L и вариант FRT-100 L – от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FEP:

12. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), MaxyGene (Axygen, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), четырехканальный «Джин» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

При работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT:

14. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в

режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).

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

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

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Материалом для исследования служит отделяемое конъюнктивы человека.

ФОРМАТ FER

ФОРМАТ FER

СОСТАВ

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ³	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ВКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ):

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

Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «ЭДЭМ» – комплект реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Транспортная среда ТС-ЭДЭМ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок
ВКО-Дилуент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	100 пробирок

³ При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FEP

К комплекту прилагается реагент:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-буфер-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 5.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В и С с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>C.trachomatis</i> А, В, С раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон-red ⁴	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ⁵	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО ДНК <i>C.trachomatis</i> А, В, С	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.

⁴ Реагент используется при исследовании проб ДНК, выделенных с помощью набора «ДНК-сорб-АМ».

⁵ Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).

ФОРМАТ FEP

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 L – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В и С с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь <i>C.trachomatis</i> А, В, С-lyo	Порошок белого цвета	-	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-Фон <i>C.trachomatis</i> А, В, С-lyo	Порошок белого цвета	-	15 пробирок объемом 0,2 мл
ПКО ДНК <i>C.trachomatis</i> А, В, С-lyo	Порошок белого цвета	-	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» или «ЭДЭМ» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, или другие, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, в соответствии с инструкцией к используемому набору. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL)⁶.

⁶ При использовании комплекта реагентов «ЭДЭМ» внутренний контрольный образец (ВКО-FL) входит в состав реагента ВКО-дилуент.

При использовании формы выпуска набора 4 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». При использовании формы выпуска набора 5 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ЭДЭМ».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

А1. Подготовка пробирок при использовании комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FL *C.trachomatis* А, В, С для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. В пробирки с ПЦР-смесью-1-FL *C.trachomatis* А, В, С на поверхность застывшего воска внести по 10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FL *C.trachomatis* А, В, С.
3. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
4. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
5. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКД ДНК *C.trachomatis* А, В, С.
 - в) отрицательный контроль экстракции ДНК (В-) – внести в пробирку 10 мкл пробы, выделенной из ОКО.
6. Приготовить образец «Фон».
 - 6а. При исследовании проб ДНК, выделенных с помощью набора «ДНК-сорб-

АМ», для приготовления образца **«Фон»** в пробирку с ПЦР-смесью-1-FL ***C.trachomatis* A, B, C** на поверхность застывшего воска внести **20 мкл ПЦР-смеси-Фон-red**. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).

6b. При исследовании проб ДНК, выделенных с помощью набора **«ЭДЭМ»**, для приготовления образца **«Фон»** в пробирку с ПЦР-смесью-1-FL ***C.trachomatis* A, B, C** на поверхность застывшего воска внести **10 мкл ПЦР-буфера-Фон** и **10 мкл пробы «В–»**, полученной в соответствии с инструкцией к набору **«ЭДЭМ»**. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

А2. Подготовка пробирок при использовании комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100 L

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл.

А2-1. Подготовка пробирок при анализе проб ДНК, полученных при экстракции с помощью набора «ДНК-сорб-АМ»

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью ***C.trachomatis* A, B, C-Iyo** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. В подготовленные пробирки внести по **25 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
3. Приготовить раствор **ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo**. Для этого необходимо в пробирку с **ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo** добавить **200 мкл ДНК-буфера**, тщательно перемешать и осадить капли кратковременным центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-2 с). Приготовленный раствор **ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo** можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 9 мес.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **25 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **15 мкл ДНК-буфера** и **10 мкл предварительно подготовленного раствора ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В–)** – внести в пробирку

25 мкл пробы, выделенной из ОКО.

5. Приготовить образец «Фон»: в пробирку с ПЦР-смесью-Фон *C.trachomatis* A, B, C-Iyo внести **25 мкл ДНК-буфера**.
6. Через 20 с (или более) после внесения проб убедиться, что лиофилизированная смесь растворилась (раствор в пробирках прозрачный), если же в какой-либо из пробирок смесь не полностью растворилась, тщательно перемешать ее пипетированием.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

A2-2. Подготовка пробирок при анализе проб ДНК, полученных при экстракции с помощью комплекта реагентов «ЭДЭМ»

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью *C.trachomatis* A, B, C-Iyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. Внести в каждую из пробирок по **15 мкл ДНК-буфера**.
3. Затем в подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов, и тщательно перемешать пипетированием.
4. Приготовить раствор ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo. Для этого необходимо в пробирку с ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo добавить **200 мкл ДНК-буфера**, тщательно перемешать и осадить капли кратковременным центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-2 с). Приготовленный раствор ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 9 мес.
5. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл** предварительно подготовленного раствора ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo.
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.
6. Приготовить образец «Фон»: в пробирку с ПЦР-смесью-Фон *C.trachomatis* A, B, C-Iyo внести **15 мкл ДНК-буфера** и **10 мкл пробы «В–»**, полученной в соответствии с инструкцией к набору «ЭДЭМ», и тщательно перемешать пипетированием.
7. Через 20 с (или более) после внесения проб убедиться, что

лиофилизированная смесь растворилась (раствор в пробирках прозрачный), если же в какой-либо из пробирок смесь растворилась не полностью, тщательно перемешать ее пипетированием.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования: при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FEP – программу «**АмплиСенс-1-FEP**» (см. табл. 1), при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FEP-100 L - программу «**АмплиСенс-1-FEP F**» (см. табл. 2).
2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Таблица 1

Программа «АмплиСенс-1-FEP»

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

Программа «АмплиСенс-1-FEP F»

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

Примечание – Программы термоциклирования/амплификации для других моделей амплификаторов описаны в методических рекомендациях «Исследование клинического материала на наличие ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией».

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

- по каналу FAM (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С.
- по каналу HEX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis* любого серовара.
- по каналу ROX (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш к

ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С обнаружена, если для данной пробы сигнал по каналу FAM выше установленного для этого канала порогового значения положительного результата.
- ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С не обнаружена, обнаружена ДНК *Chlamydia trachomatis* других сероваров, если для данной пробы сигнал по каналу FAM ниже установленного для этого канала порогового значения отрицательного результата, а сигнал по каналу HEX выше установленного для этого канала порогового значения положительного результата.
- ДНК *Chlamydia trachomatis*, включая серовары А, В, С, не обнаружена, если для данной пробы сигнал по каналам FAM и HEX ниже установленных для этих каналов пороговых значений отрицательного результата, а сигнал по каналу ROX выше установленного порогового значения.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы сигнал по каналам FAM и HEX ниже порогового значения отрицательного результата, и сигнал по каналу ROX ниже установленного порогового значения.
- Результат анализа **сомнительный**, если для данной пробы сигнал по каналу FAM и/или по каналу HEX выше установленного порогового значения отрицательного результата, но ниже порогового значения положительного результата (сигнал находится между пороговыми значениями).

ФОРМАТ FEP

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

ВНИМАНИЕ!

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

ФОРМАТ FRT

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

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

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

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ВКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

Транспортная среда с муколитиком (ТСМ):

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

Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «ЭДЭМ» – комплект реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» **включает**:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Транспортная среда ТС-ЭДЭМ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок
ВКО-Дилуент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	100 пробирок

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

ФОРМАТ FRT

К комплекту прилагается реагент:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-буфер-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 5.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>C.trachomatis</i> А, В, С 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 ДНК <i>C.trachomatis</i> А, В, С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>C.trachomatis</i> А, В, С	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПКО ДНК <i>C.trachomatis</i> А, В, С	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.

ФОРМАТ FRT

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 L – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В и С с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь <i>C.trachomatis</i> А, В, С-lyo	Порошок белого цвета	-	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПКО ДНК <i>C.trachomatis</i> А, В, С-lyo	Порошок белого цвета	-	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов «ДНК-сорб-АМ» или «ЭДЭМ» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в соответствии с инструкцией к используемому набору. Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL)⁸.

⁸ При использовании комплекта реагентов «ЭДЭМ» внутренний контрольный образец (ВКО-FL) входит в состав реагента ВКО-дилуент.

При использовании формы выпуска набора 4 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ». При использовании формы выпуска набора 5 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ЭДЭМ».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

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

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

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

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

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

А3. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 L

А3-1. Подготовка пробирок при анализе проб ДНК, полученных при экстракции с помощью набора «ДНК-сорб-АМ»

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью *C.trachomatis* А, В, С-Iyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. В подготовленные пробирки внести по 25 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
3. Приготовить раствор ПКО ДНК *C.trachomatis* А, В, С-Iyo. Для этого необходимо в пробирку с ПКО ДНК *C. trachomatis* А, В, С-Iyo добавить 200 мкл ДНК-буфера, тщательно перемешать и осадить капли кратковременным

центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1-2 с). Приготовленный раствор ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo можно хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение 9 мес.

4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **25 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **15 мкл ДНК-буфера** и **10 мкл** предварительно подготовленного раствора ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo.
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В–)** – внести в пробирку **25 мкл** пробы, выделенной из ОКО.
5. Через 20 с (или более) после внесения проб и контролей убедиться, что лиофилизированная смесь растворилась (раствор в пробирках прозрачный), если же в какой-либо из пробирок смесь не полностью растворилась, тщательно перемешать ее пипетированием.

A3-2. Подготовка пробирок при анализе проб ДНК, полученных при экстракции с помощью комплекта реагентов «ЭДЭМ»

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью *C.trachomatis* A, B, C-Iyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. Внести в каждую из пробирок по **15 мкл ДНК-буфера**.
3. Затем в подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
4. Приготовить раствор ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo. Для этого необходимо в пробирку с ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo добавить **200 мкл ДНК-буфера**, тщательно перемешать и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса (1-2 с). Приготовленный раствор ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-Iyo можно хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение 9 мес.
5. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл** предварительно подготовленного раствора ПКО ДНК *C. trachomatis* A, B, C-Iyo.
 - в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.
6. Через 20 с (или более) после внесения проб убедиться, что лиофилизированная

смесь растворилась (раствор в пробирках прозрачный), если же в какой-либо из пробирок смесь не полностью растворилась, тщательно перемешать ее пипетированием.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала **«АмплиСенс-1»** (см. табл. 4).

Таблица 4

Программа «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа ⁹			Приборы планшетного типа ¹⁰		
	Температура, °C	Время	Число повторов циклов	Температура, °C	Время	Число повторов циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX (при одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

2. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратковременным (1-3 с) центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
3. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
4. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
5. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

⁹ например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

¹⁰ например, iCycler iQ, iQ5 (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С;
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* любого серовара;
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- **ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С не обнаружена, обнаружена ДНК *Chlamydia trachomatis* других сероваров**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct*, а в таблице результатов по каналу для детекции флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данной пробы по каналу для флуорофора JOE должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- **ДНК *Chlamydia trachomatis*, включая серовары А, В, С, не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов соответственно по каналам для флуорофоров FAM и JOE не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице

результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла C_t , не превышающее указанное граничное значение.

- **Результат анализа невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла C_t по каналам для флуорофоров FAM и JOE, а по каналу для флуорофора ROX значение C_t также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Исследование клинического материала на наличие ДНК *Chlamydia trachomatis* сероваров А, В, С методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 5).

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла C_t по каналам FAM и/или JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, для которых отсутствует значение порогового цикла, соответственно, по каналам FAM и/или JOE.

ФОРМАТ FRT

2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (В–) или/и отрицательного контроля ПЦР (К–) по каналам FAM или/и JOE определено значение порогового цикла C_t , необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, для которых определено значение порогового цикла, соответственно, по каналам FAM или/и JOE.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

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

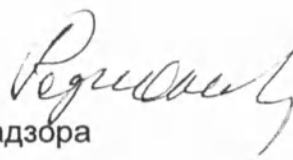
Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» и «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)» хранить при температуре от 2 до 25 °С. ВКО комплексный, ВКО-FL и ОКО (из комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ»), комплект реагентов «ЭДЭМ» и комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С.

ПЦР-смесь-1-FL *C.trachomatis* A, B, C, ПЦР-смесь *C.trachomatis* A, B, C-lyo, ПЦР-смесь-Фон *C.trachomatis* A, B, C-lyo хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь *C.trachomatis* A, B, C-lyo, ПЦР-смесь-Фон *C.trachomatis* A, B, C-lyo и ПКО ДНК *C.trachomatis* A, B, C-lyo (до растворения) хранить в пакетах с влагопоглотителем.

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

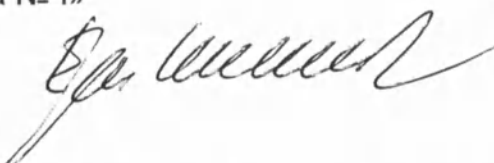
Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-A, B, C-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).¹¹

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
Управления делами Президента
Российской Федерации



Е.Л. Никонов

¹¹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное
число тестов



Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата изготовления



Производитель



Беречь от влаги

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 31 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

В.В.Малеев

