

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
«30» ноября 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для диагностики бактериального вагиноза (определения
концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*,
Lactobacillus spp. и общего количества бактерий) в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией

**«АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный
вагиноз-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	4
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	9
ФОРМАТ FRT.....	10
СОСТАВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	12
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	12
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	13
А. Подготовка пробирок для амплификации.....	13
А1. Подготовка пробирок для амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F	13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	14
АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	19
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей.....	20
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	21

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

БВ	- бактериальный вагиноз
КС	- коэффициент соотношения
К–	- отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПКО BV– ПКО BV+	- положительные контрольные образцы этапа экстракции
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
TSM	- транспортная среда с муколитиком
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
BV– BV+	- положительные контроли экстракции
FC1, FC2	- ДНК-калибраторы
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» предназначен для диагностики бактериального вагиноза методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Набор реагентов позволяет оценить соотношение общего количества бактерий, лактобактерий и условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*) во влагалищном биотопе; общее количество бактерий позволяет оценить адекватность забранного материала. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенные из отделяемого влагалища и соскоба эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища.

Соотношение логарифмов концентраций *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий (КС1), а также соотношение логарифмов концентраций *Lactobacillus* spp. и условно-патогенной микрофлоры – *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* – (КС2), позволяют с высокой точностью диагностировать бактериальный вагиноз – заболевание, связанное с подавлением нормальной микрофлоры влагалища (*Lactobacillus* spp.) и заменой ее условно-патогенной (в том числе *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*).

Использование набора реагентов «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» позволяет проводить динамические наблюдения за состоянием влагалищного биотопа и контролировать эффективность проводимой терапии.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения состояния микробиоценоза влагалища (количественное определение ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в клиническом материале) основан на:

- 1) экстракции тотальной ДНК из клинического образца – соскоба эпителиальных клеток со слизистой влагалища или отделяемого влагалища, помещенных в 0,5 мл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)»;
- 2) одновременном проведении реакции амплификации (мультипрайм-ПЦР) участков ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». Для определения количества копий ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в стандартном объеме клинического образца используются количественные стандарты (калибраторы), позволяющие определить число копий ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в реакционной пробирке.

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

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F;

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

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F;

Форма 4 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для экстракции ДНК и амплификации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». На этапе экстракции ДНК необходимо использовать дополнительный реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для амплификации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. На этапе экстракции ДНК необходимо использовать дополнительный реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Форма комплектации 4 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 4 используется 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, копий/мл
Соскоб эпителиальных клеток боковых стенок влагалища	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F	5×10^3
Отделяемое влагалища	«Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F	5×10^3

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общую бактериальную ДНК. Специфическая активность набора реагентов доказана при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результатов методом секвенирования фрагментов амплификации.

Отсутствовали неспецифические реакции при тестировании образцов ДНК человека и панели образцов ДНК следующих микроорганизмов: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, HSV 1 и 2 типа, CMV, HPV и ДНК человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте 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 (TCM)» (флакон объемом 50 мл) (ТУ 9398-098-01897593-2009) – при работе с формами комплектации 1–4.
2. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-АМ» (ТУ 9398-036-01897593-2009) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора – при работе с формами комплектации 2–4.
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-комплектами» вариант FRT-100 F, FRT-200 F – от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
8. Штативы для пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для

выделенных проб ДНК.

10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.
12. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия, Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 или 0,1 мл:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Ахуген, США) - при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, 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. **Для проведения анализа используется только клинический материал, полученный от женщин.**

Материалом для исследования служит соскобное отделяемое влагалища (соскоб эпителиальных клеток с боковых стенок влагалища). Получение материала следует производить с помощью универсального зонда или зонда-тампона на пластиковой основе в пробирку объемом 2 мл с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)». Отделяемое следует забирать в достаточном количестве. Погрузить рабочую часть зонда в вагинальное отделяемое задненижнего свода влагалища и, вращая зонд, провести по поверхности эпителия, максимально полно набирая материал на зонд.

Перенести зонд в пробирку с «Транспортной средой с муколитиком (ТСМ)». Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить в области насечки и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае адекватного забора материала транспортная среда должна помутнеть, а ее цвет должен измениться с розового на лимонно-желтый при кислом pH отделяемого. Цвет может не измениться или измениться незначительно, если pH отделяемого больше 4,5. Если в

пробирке с транспортной средой уже находится материал из цервикального канала, который содержит цервикальную слизь, цвет транспортной среды при добавлении в нее вагинального отделяемого имеющего кислую pH ($< 4,5$) изменяться не будет, т.к. цервикальная слизь значительно защелачивает среду. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. Возможно исследование самостоятельно забранного материала, произведенное согласно инструкции к «Комплекту для самостоятельного взятия мазка из влагалища для микроскопии и диагностики инфекций методом ПЦР».

Допускается **хранение** вышеперечисленного **материала** до проведения исследования **в течение 48 ч** при температуре не выше плюс 20-22 °С, **2 недели** при температуре **не выше минус 2–8 °С**. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Перед проведением экстракции ДНК необходимо убедиться в том, что зонды оставлены в пробирках с исследуемым материалом, пробирки плотно закрыты, транспортная среда присутствует в пробирках с клиническим материалом в достаточном для проведения исследования объеме (не менее 500 мкл).

Перед проведением экстракции ДНК необходимо разморозить образцы (в случае, если они длительно хранились), затем тщательно встряхнуть пробирки, содержащие исследуемый материал, на вортексе и сбросить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

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 ²	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

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации фрагментов ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	FC1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
	FC2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПКО BV+	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО BV-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F – комплект реагентов

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

ФОРМАТ FRT

для амплификации фрагментов ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT		Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Полимераза (TaqF)		Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
ДНК-буфер		Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ДНК-калибраторы	FC1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирка
	FC2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирка

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив		Описание	Объем, мл	Кол-во
ПКО BV+		Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО BV-		Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли и калибраторы.

К комплекту реагентов также прилагаются:

1. Диск, содержащий программу «АмплиСенс ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL» (в формате Microsoft Excel) для обработки данных и получения результатов
2. Инструкция на бумажном носителе.
3. Вкладыш со значениями калибраторов и характеристиками контрольных образцов для данной серии набора реагентов.

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 используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов для диагностики бактериального вагиноза (определения концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в клиническом материале) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL».

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

При работе с формой выпуска набора 1 для экстракции ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ».

При работе с формами выпуска набора 1–3 для экстракции ДНК необходимо использовать дополнительный реагент «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) вносится 100 мкл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)». В пробирку положительного контроля экстракции (BV–) вносится 90 мкл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» и 10 мкл ПКО BV–; в пробирку положительного контроля экстракции (BV+) вносится 90 мкл «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)» и 10 мкл ПКО BV+.

ВНИМАНИЕ! Добавления внутреннего контрольного образца не требуется!

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»**А. Подготовка пробирок для амплификации**

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

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

А1. Подготовка пробирок для амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

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

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением эксперимента. Смешивать реагенты из расчета расходования на одну реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз;
- 5 мкл смеси ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF).

1. Предварительно необходимо подготовить смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). Содержимое одной пробирки с полимеразой (TaqF) (60 мкл) необходимо полностью перенести в пробирку с ПЦР-смесью-2-FRT (600 мкл) и аккуратно перемешать на вортексе, не допуская образования пены. Промаркировать пробирку, указав дату приготовления смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленная смесь рассчитана на 120 реакций. Смесь хранить при температуре от 2 до 8°C в течение 3 мес и использовать по мере необходимости.

В случае если данная смесь не может быть израсходована в течение трех месяцев, необходимо готовить смесь на меньшее количество реакций, например, смешать 150 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 15 мкл полимеразы (TaqF) (полученная смесь рассчитана на 30 реакций).

2. Разморозить и встряхнуть на вортексе пробирку с ПЦР-смесью-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз, сбросить капли с крышки пробирки кратковременным центрифугированием.

Сделать расчет на необходимое число реакций для количественного определения ДНК, включающего тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно **расчетной таблице, приведенной в приложении 1**. Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку еще **5 контрольных точек** этапа амплификации: **два ДНК-калибратора (FC1 и FC2) в двух повторах, и**

отрицательный контроль (ДНК-буфер).

Необходимо брать реагенты с запасом: для тестирования N образцов приготовить реагенты для (N+1) реакций.

3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз и ПЦР-смеси-2-FRT с полимеразой (TaqF), приготовленной согласно п.1.
4. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

7. Поставить контрольные реакции:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
- б) **ДНК-калибраторы** – внести в каждую пробирку по **10 мкл** каждого ДНК-калибратора (**FC1, FC2**);
- в) **отрицательный контроль экстракции ДНК (OK)** – внести в пробирку 10 мкл ДНК, выделенной из «Транспортной среды с муколитиком (ТСМ)»;
- г) **положительный контроль экстракции (BV-)** – в пробирку внести 10 мкл ДНК, выделенной из **ПКО BV-**;
- д) **положительный контроль экстракции (BV+)** – в пробирку внести 10 мкл ДНК, выделенной из **ПКО BV+**.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «**АмплиСенс-1**» (см. табл. 1, 2).

Таблица 1

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа³

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
Hold/ Удерж. темп-ры	95	15 мин	-	1
1 Cycling/ Циклирование	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
2 Cycling/ Циклирование	95	5 с	-	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow ROX/Orange Cy5/Red	
	72	15 с		

Таблица 2

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа⁴

Этап	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	—	1
2	95	5 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	15 с	—	
3	95	5 с	—	40
	60	30 с	FAM, JOE/HEX, ROX, Cy5	
	72	15 с	—	

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Gardnerella vaginalis*;
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о

³ 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.

⁴ например, iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению

накоплении продукта амплификации ДНК *Atopobium vaginae*;

- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Lactobacillus* spp.;
- по каналу для флуорофора Cy5 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК общего количества бактерий.

Характеристикой сигнала является пороговый цикл – цикл, которому соответствует точка пересечения кривой накопления флуоресценции и линии порога. Именно значения пороговых циклов анализируются программой автоматического учета результатов. На основании значений порогового цикла *Ct* (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией) и, исходя из заданных значений калибраторов FC1, FC2, происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений копий ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций калибраторов для каждой серии набора реагентов указываются во вкладыше к ПЦР-комплекту и должны быть заданы в соответствующих ячейках программы автоматической интерпретации результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- Результат амплификации исследуемого образца по каналам **FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red** считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в реальном времени S-образный вид и однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции.
- Результат амплификации исследуемого образца по каналам **FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange, Cy5/Red** считается **отрицательным** в случае отсутствия кривой типичной S-образной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения *Ct*).
- Результат анализа образца считается **недостоверным** в случае отсутствия сигнала по каналу **Cy5/Red** или в случае, когда значение Конц.расч. по каналу **Cy5/Red** для исследуемого образца менее 10000 копий на реакцию.
- Результат анализа образца считается **невалидным** в случае отсутствия сигнала по каналу **Cy5/Red** (нет значения *Ct*) или в случае, когда значение Конц.расч. для исследуемого образца по каналу **ROX/Orange** превышает значение Конц.расч. по каналу **Cy5/Red** более, чем на 0,5 Lg.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Конц.расч. для контрольных образцов указаны во вкладыше, прилагаемом к «ПЦР-комплекту».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контрольных образцов ОК, BV–, BV+, К– в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 3), а для калибраторов FC1 и FC2 определено значение *Ct*.

Таблица 3

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Результаты амплификации по каналу, копий/реакцию			
		FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red
ОК	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
BV-	Экстракция ДНК	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение больше граничного	Определено значение больше граничного
BV+	Экстракция ДНК	Определено значение больше граничного	Определено значение больше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение больше граничного
К-	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного
FC1, FC2	ПЦР	Определено значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	Определено значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	Определено значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация	Определено значение <i>Ct</i> и расчетная концентрация

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Способ 1

Расчет коэффициентов соотношений (KC1, KC2), на основании которых производится интерпретация полученных данных для исследуемых и контрольных образцов, расчет концентраций ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и ДНК общего количества бактерий осуществляется автоматически с помощью программы «АмплиСенс Флороценоз / Бактериальный вагиноз» согласно прилагаемой к ней инструкции. Алгоритм получения результатов описан в методических рекомендациях по применению набора реагентов для диагностики бактериального вагиноза (определения количества ДНК *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. и общего количества бактерий в клиническом материале) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-FL»

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Интерпретация полученных данных представлена в табл. 4.

Таблица 4

Определение состояния микроценоза влагалища

Состояние микроценоза влагалища	KC1(Lg Lac-Lg Bac)	KC2(Lg Lac-Lg(Gv+Av))
Нормоценоз	$-1 \leq KC1 < 1$	$KC2 \geq 1$
Мезоценоз	$-2 \leq KC1 < 1$	$KC2 < 1$
Дисбиоз анаэробный (БВ)	$KC1 < -2$	$KC2 < 1$
Дисбиоз неясного генеза	$KC1 < -1$	$KC2 \geq 1$

Способ 2 (вспомогательный)

Определение степени дисбиоза влагалища по процентному содержанию в пробе ДНК *Lactobacillus* spp, ДНК *Gardnerella vaginalis*, ДНК *Atopobium vaginae* относительно общего количества бактерий (ОКБ).

Расчет процентного содержания ДНК *Lactobacillus* spp, ДНК *Gardnerella vaginalis*, ДНК *Atopobium vaginae* относительно общего количества бактерий осуществляется автоматически с помощью программы «АмплиСенс Флороценоз / Бактериальный вагиноз» согласно прилагаемой к ней инструкции.

Интерпретация полученных данных представлена в табл. 5.

Таблица 5

Определение степени дисбиоза влагалища

Степень дисбиоза влагалища	Доля лактобактерий к ОКБ	Количество Gv, Av к ОКБ*
Нормоценоз	>30%	$<1\%$ -незначимое $1-10\%$ -значимое $>10\%$ -повышенное
Легкий дисбиоз	10-30%	
Умеренный дисбиоз	1-10%	
Выраженный дисбиоз (БВ)	<1%	

*Примечание – Абсолютное количество Gv, Av не имеет клинического значения.

ВНИМАНИЕ! После обработки данных с помощью программы «АмплиСенс Флороценоз / Бактериальный вагиноз» положительный контроль BV– должен интерпретироваться как «Нормоценоз», положительный контроль BV+ – как «Дисбиоз анаэробный (бактериальный вагиноз)».

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз-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)⁵.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГОУ ДПО "РМАПО Росздрава"
д.м.н., профессор



В.В. Долгов

⁵Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Схема приготовления реакционных смесей

Объем реагентов на одну реакцию (мкл)	Объем реактивов на указанное количество реакций	
	10,0	5,0
Число реакций для количественного определения (включая 3 контроля этапа экстракции)	ПЦР-смесь-1-FRT ФлороЦеноз / Бактериальный вагиноз*	Смесь ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)*
4	100	50
5	110	55
6	120	60
7	130	65
8	140	70
9	150	75
10	160	80
11	170	85
12	180	90
13	190	95
14	200	100
15	210	105
16	220	110
17	230	115
18	240	120
19	250	125
20	260	130
21	270	135
22	280	140
23	290	145
24	300	150
25	310	155
30	360	180

* Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки пяти контрольных точек этапа амплификации ((2 ДНК-калибратора FC1, FC2 (по два повтора) и отрицательный контроль ДНК-буфер).

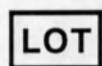
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



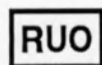
Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



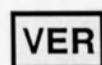
Максимальное
число тестов



Только для
исследовательских
целей



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата изготовления



Производитель

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 21 листов

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

В.В.Малеев

