

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстБио» – Генеральный
директор Управляющей
компании ООО «МБК»

Д.Л. Симачева
«19/10» октября 2014 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения ДНК
Neisseria gonorrhoeae, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma*
genitalium и *Trichomonas vaginalis* методом полимеразной
цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro

«АмплиПрайм[®] NCMT»

АмплиПрайм[®]



ООО «НекстБио»,
Российская Федерация, 111394,
город Москва, улица Полимерная, дом 8, стр. 2

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	10
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	12
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	21
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	21
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	22
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	22
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100)	24
СОСТАВ	24
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	24
А. Подготовка пробирок для амплификации	24
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	25
В. Анализ и интерпретация результатов	27
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)	33
СОСТАВ	33
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	33
А. Подготовка пробирок для амплификации	33
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	35
В. Анализ и интерпретация результатов	36
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 3 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)	42
СОСТАВ	42
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	42
А. Подготовка пробирок для амплификации	42
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	43
В. Анализ и интерпретация результатов	45
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 4 (комплекты реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб- УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)	51
СОСТАВ	51
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	52
А. Подготовка пробирок для амплификации	52
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	53
В. Анализ и интерпретация результатов	54
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	61
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	61
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	63
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	64

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеотидтрифосфат
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
K1, K2	- ДНК-калибраторы
K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
НК	- нуклеиновые кислоты
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® NCMT» предназначен для качественного и количественного определения ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* в биологическом материале (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы; моча, секрет предстательной железы) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекций, передаваемых половым путем.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных Производителем.

ВНИМАНИЕ! В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL¹) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, 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 с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* методом ПЦР в режиме «реального времени» основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с ДНК-калибраторами – образцами с известной концентрацией ДНК-мишени. По результатам амплификации ДНК-калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Концентрацию ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* возможно определить в двух вариантах. В **первом варианте** определяются абсолютные значения концентраций ДНК микроорганизмов, отражающие количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов в 1 мл биологического образца (ГЭ/мл). **Второй вариант** расчета концентрации применим для биологического материала, содержащего клетки, и требует проведения параллельного тестирования пробы ДНК с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT» и набора реагентов для количественного определения ДНК

¹ ВКО-FL входит в состав комплекта реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из каждого исследуемого материала.

человека, рекомендованных Производителем. Во втором варианте рассчитываются нормированные значения концентрации ДНК микроорганизмов, отражающие количество клеток микроорганизмов относительно клеток слизистой оболочки человека.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится 5 реакций – амплификация участков ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis*, а также амплификация последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis*, а также ДНК ВКО-FL регистрируются по 5 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
ДНК-мишень	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК <i>T. vaginalis</i>	ДНК ВКО-FL
Область амплификации	16S rRNA gene	cryptic plasmid	gyrB gene	ДНК-повторы для ПЦР-идентификации	искусственно синтезированная последовательность

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100.

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

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

Форма 4 включает комплекты реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN.

Формы комплектации 1, 2, 3 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и

позволяют выявлять ДНК в качественном и количественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Производителем.

Форма комплектации 2 может быть использована совместно с автоматическими станциями приготовления реакционных смесей.

Форма комплектации 4 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», и позволяет выявлять ДНК в качественном и количественном формате.

Форма комплектации 4 может быть использована совместно с автоматическими станциями пробоподготовки и приготовления реакционных смесей.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность и линейный диапазон измерения

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ²	Линейный диапазон измерения, ГЭ/мл
отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм» ⁴ МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	<i>N. gonorrhoeae</i>	5x10 ²	2x10 ³ – 1x10 ⁷
				<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²	
				<i>M. genitalium</i>	1x10 ³	
				<i>T. vaginalis</i>	5x10 ¹	2x10 ² – 1x10 ⁷
	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ЭДЭМ» ⁴	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	<i>N. gonorrhoeae</i>	5x10 ²	-
				<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²	
				<i>M. genitalium</i>	1x10 ³	
				<i>T. vaginalis</i>	5x10 ¹	
отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, конъюнктивы	АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	<i>N. gonorrhoeae</i>	5x10 ²	2x10 ³ – 1x10 ⁷
				<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²	
				<i>M. genitalium</i>	Не используется ⁵	

² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ):

– в биологическом материале (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы), помещенном в указанную транспортную среду, в пересчете на 1 мл;

– в пересчете на 1 мл образца мочи или секрета предстательной железы.

³ Форма комплектации 3 или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ».

⁴ Используется только при качественном определении.

⁵ Выявление данного микроорганизма в указанном виде биоматериала не имеет клинического значения.

	ЭДЭМ» ³			<i>T. vaginalis</i>		
	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ЭДЭМ» ⁴	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	<i>N. gonorrhoeae</i>	5x10 ²	–
				<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²	
				<i>M. genitalium</i>	Не используется ⁵	
				<i>T. vaginalis</i>		
отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	<i>N. gonorrhoeae</i>	5x10 ²	2x10 ³ – 1x10 ⁷
				<i>C. trachomatis</i>	Не используется ⁵	
				<i>M. genitalium</i>		
				<i>T. vaginalis</i>		
	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ЭДЭМ» ⁴	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	<i>N. gonorrhoeae</i>	5x10 ²	–
				<i>C. trachomatis</i>	Не используется ⁵	
				<i>M. genitalium</i>		
				<i>T. vaginalis</i>		
секрет предстательной железы	–	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	<i>N. gonorrhoeae</i>	5x10 ²	2x10 ³ – 1x10 ⁷
				<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²	
				<i>M. genitalium</i>	1x10 ³	
				<i>T. vaginalis</i>	5x10 ¹	2x10 ² – 1x10 ⁷
моча	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	<i>N. gonorrhoeae</i>	1x10 ³	4x10 ³ – 1x10 ⁷
				<i>C. trachomatis</i>	1x10 ³	
				<i>M. genitalium</i>	2x10 ³	
				<i>T. vaginalis</i>	1x10 ²	4x10 ² – 1x10 ⁷
	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ЭДЭМ» ⁴	«ПЦР-комплект» вариант FRT-100, FRT-100 FN, FRT-L	<i>N. gonorrhoeae</i>	1x10 ³	–
				<i>C. trachomatis</i>	1x10 ³	
				<i>M. genitalium</i>	2x10 ³	
				<i>T. vaginalis</i>	1x10 ²	

Данные значения характеристик достигаются при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая чувствительность в отношении каждого из микроорганизмов сохраняется и в присутствии высоких концентраций ДНК других анализируемых микроорганизмов – до 10⁹ ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Candida albicans*,

Mycoplasma hominis, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, HSV 1 и 2 типа, CMV, HPV, а также геномной ДНК человека.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Воспроизводимость, повторяемость и правильность

Воспроизводимость и повторяемость были определены путем тестирования модельного образца биоматериала. Модельный образец биоматериала был приготовлен разведением стандартного образца предприятия, содержащего ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* в трех диапазонах концентраций (от 5×10^3 до 1×10^4 , от 5×10^4 до 1×10^5 , более 5×10^5 ГЭ/мл) в биологическом материале, не содержащем ДНК каких-либо других возбудителей ИППП.

Правильность была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в концентрации 5×10^4 ГЭ/мл.

Таблица 3

Воспроизводимость

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, Ig	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<i>N. gonorrhoeae</i>	от 5×10^3 до 1×10^4	80	3,88	0,07	1,9
<i>C. trachomatis</i>		80	3,87	0,08	2,1
<i>M. genitalium</i>		80	3,87	0,10	2,6
<i>T. vaginalis</i>		80	3,93	0,05	1,3
<i>N. gonorrhoeae</i>	от 5×10^4 до 1×10^5	80	4,86	0,10	2,0
<i>C. trachomatis</i>		80	4,88	0,09	1,9
<i>M. genitalium</i>		80	4,85	0,09	1,9
<i>T. vaginalis</i>		80	4,81	0,05	1,0
<i>N. gonorrhoeae</i>	более 5×10^5	80	5,83	0,07	1,2
<i>C. trachomatis</i>		80	5,88	0,09	1,5
<i>M. genitalium</i>		80	5,89	0,09	1,5
<i>T. vaginalis</i>		80	5,83	0,07	1,2

Таблица 4

Повторяемость

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Количество повторов	Среднее значение концентрации, Ig	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<i>N. gonorrhoeae</i>	от 5×10^3 до 1×10^4	40	3,90	0,06	1,5
<i>C. trachomatis</i>		40	3,88	0,08	2,0
<i>M. genitalium</i>		40	3,88	0,10	2,5
<i>T. vaginalis</i>		40	3,92	0,04	1,1
<i>N. gonorrhoeae</i>	от 5×10^4 до	40	4,86	0,09	1,9

<i>C. trachomatis</i>	1x10 ⁵	40	4,89	0,09	1,8
<i>M. genitalium</i>		40	4,84	0,09	1,9
<i>T. vaginalis</i>		40	4,82	0,04	0,8
<i>N. gonorrhoeae</i>	более 5x10 ⁵	40	5,84	0,07	1,2
<i>C. trachomatis</i>		40	5,84	0,08	1,4
<i>M. genitalium</i>		40	5,88	0,09	1,5
<i>T. vaginalis</i>		40	5,83	0,06	1,1

Таблица 5

Правильность

Микроорганизм	Количество повторов	Среднее значение измерения, lg	Установленное значение	Систематическая погрешность (В)	
				lg	%
<i>N. gonorrhoeae</i>	100	4,85	4,86	0,01	0,2
<i>C. trachomatis</i>	100	4,85	4,79	0,06	1,25
<i>M. genitalium</i>	100	4,95	4,95	0	0
<i>T. vaginalis</i>	100	4,78	4,70	0,08	1,7

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 6

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиПрайм[®] NCMT» в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиПрайм [®] NCMT»		Результаты применения референтного метода ⁶							
			<i>N. gonorrhoeae</i>		<i>C. trachomatis</i>		<i>M. genitalium</i>		<i>T. vaginalis</i>	
			положительных	отрицательных	положительных	отрицательных	положительных	отрицательных	положительных	отрицательных
Отделяемое слизистой оболочки уrogenитального тракта	Всего исследовано 698 образцов	положительных	102	0	108	0	106	1	101	0
		отрицательных	1	595	0	590	1	590	0	597
Отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	Всего исследовано 254 образца	положительных	124	0	101	0	0	0	0	0
		отрицательных	0	130	0	153	0	254	0	254
Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	Всего исследовано 214 образцов	положительных	105	1	0	0	0	0	0	0
		отрицательных	1	107	0	214	0	214	0	214
Отделяемое конъюнктивы	Всего исследовано 330 образцов	положительных	101	0	106	0	0	0	0	0
		отрицательных	0	229	0	224	0	330	0	330
Моча	Всего исследовано 548 образцов	положительных	102	1	103	0	109	1	111	1
		отрицательных	1	444	0	445	1	437	1	435
Секрет предстательной железы	Всего исследовано 431 образец	положительных	107	0	113	0	103	0	100	0
		отрицательных	0	324	0	318	0	328	0	331

Были использованы 698 образцов отделяемого слизистых оболочек уrogenитального тракта; 254 образца отделяемого слизистой оболочки прямой

⁶ В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс[®]» *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» (ПУ № ФСР 2009/06060).

кишки; 214 образцов отделяемого слизистой оболочки ротоглотки; 330 образцов отделяемого конъюнктивы; 548 образцов мочи; 431 образец секрета предстательной железы, полученных от пациентов с подозрением на урогенитальную инфекцию, с острым воспалением конъюнктивы, острым фарингитом, с проктитом.

Таблица 7

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиПрайм® NCMT»**

Тип образцов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 90 %), не менее %				Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 90 %), не менее %			
	NG	CT	MG	TV	NG	CT	MG	TV
отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	97,0	97,0	97,0	97,0	99,0	99,0	99,0	99,0
отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	97,0	97,0	–	–	98,0	98,0	98,0	98,0
отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	97,0	–	–	–	98,0	98,0	98,0	98,0
отделяемое конъюнктивы	97,0	97,0	–	–	98,0	98,0	98,0	98,0
моча	97,0	97,0	97,0	97,0	99,0	99,0	99,0	99,0
секрет предстательной железы	97,0	97,0	97,0	97,0	99,0	99,0	99,0	99,0

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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 необходимо всегда выполнять следующие требования:

- 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 реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты следует удалять в соответствии с требованиями 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁷. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или

⁷ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – Safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»):

- При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, включающей комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»):

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком «АмплиПрайм ТСМ»

- (РУ № ФСР 2012/14205), «Транспортная среда для мазков «АмплиПрайм ТС» (РУ № ФСР 2012/14203), «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» (форма комплектации 3 или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ») (РУ № ФСР 2012/14018) или другие рекомендованные Производителем.
2. Зонд гинекологический универсальный (например, ЗГУ «ЦМ», ООО «ЦЕНТРИМЕД», Россия или аналогичный).
 3. Зонд «Юнона» цитощетка (например, ЗАО «Медицинское предприятие Симург», Республика Беларусь или аналогичная).
 4. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный)
 5. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).

Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК

6. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
7. Лабораторная микроцентрифуга (например, MiniSpin с принадлежностями, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), США или аналогичный).
8. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия), или аналогичный).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

9. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» вариант 100С (РУ № ФСР 2012/14204), «АмплиПрайм ЭДЭМ» (форма комплектации 1 или 2) (РУ № ФСР 2012/14018) или другие рекомендованные Производителем.
10. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

При использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» совместно с автоматическими станциями для экстракции НК:

11. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл для образцов (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Закручивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся

- пробирки объемом 1,5 мл или одноразовые 96-луночные планшеты (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) – для элюции.
14. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 15. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 16. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 17. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 18. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 19. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 20. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neop 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) или аналогичная).
 21. Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК.
 22. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 23. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 24. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
- При использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» в случае ручной методики экстракции НК:
25. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл для образцов (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 26. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 27. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 28. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 29. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 30. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.
 31. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

32. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
33. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
34. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия), или аналогичный).
35. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
36. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
37. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
38. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

39. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» FRT-100 FN:
- а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc., («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
40. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США или аналогичные).
41. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США или аналогичные).
42. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.» (ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
43. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
44. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит»,

Россия, или аналогичные).

45. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 5 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие рекомендованные Производителем).
46. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
47. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
48. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры),
- отделяемое слизистой оболочки прямой кишки (мазки, соскобы),
- отделяемое слизистых оболочек ротоглотки (мазки, соскобы),
- отделяемое конъюнктивы (мазки),
- моча (осадок первой порции утренней мочи),
- секрет предстательной железы.

Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести с помощью зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой из заднебокового свода влагалища. Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая отделяемое. Материал из влагалища взять в достаточном количестве. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. В случае использования транспортной среды с муколитиком ее цвет может измениться за счет изменения pH (при кислом pH отделяемого).

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

Доступ к цервикальному каналу обеспечить с помощью одноразового или многоразового стерильного гинекологического зеркала. Взятие материала провести с помощью цервикальной цитощетки или универсального зонда в пробирку с транспортной средой. При использовании универсального зонда объем соскобного отделяемого будет меньше. Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном, затем ввести рабочую часть цитощетки/зонда в цервикальный канал и сделать два-три полных оборота по часовой стрелке. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови. Извлечь цитощетку/зонд и поместить рабочую часть, содержащую взятый материал, в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть цитощетки/зонда обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть цитощетки или универсального зонда следует максимально полно смыть биоматериал с их рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

У женщин получение отделяемого уретры проводить с помощью уретрального зонда в пробирку с транспортной средой.

Перед взятием соскоба из уретры необходимо обработать наружное отверстие уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором, чтобы удалить отделяемое из влагалища. Ввести рабочую часть зонда в уретру, несколькими вращательными движениями собрать отделяемое уретры на рабочую часть зонда. Допустимо присутствие примесей в виде слизи и крови. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый

материал, обломить в области насечки и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

У мужчин перед взятием соскоба из уретры обработать головку полового члена в области наружного отверстия уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Провести массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удалить их сухим тампоном. Ввести зонд в уретру на глубину 1–2 см. Несколькими вращательными движениями провести соскоб эпителиальных клеток. Допустимо умеренное присутствие примесей в виде слизи, крови и гноя. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой, рабочую часть зонда с материалом обломить и оставить в пробирке. В случае отсутствия насечки погрузить рабочую часть зонда в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5–10 секунд, после чего зонд удалить, а пробирку плотно закрыть. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки (соскобы) со слизистой оболочки прямой кишки

Перед взятием соскоба/мазка провести тщательный туалет с мылом и водой области вокруг анального отверстия.

Взятие материала провести с помощью зонда-тампона в пробирку с транспортной средой. Ввести зонд в анальное отверстие на глубину 3–4 см. Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок ампулы прямой кишки, максимально полно собирая отделяемое. Перенести зонд в

пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае отсутствия насечки погрузить рабочую часть зонда в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5–10 секунд, после чего зонд удалить, а пробирку плотно закрыть. Следует помнить, что в этом случае значительная часть материала может не попасть в пробирку с транспортной средой и материал будет неадекватным для исследования. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. Допустимо умеренное присутствие примесей в виде слизи, крови, гноя и каловых масс.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки (соскобы) со слизистой оболочки ротоглотки

Мазки забирать сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) поместить в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, аккуратно обломить пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части и оставить рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки с конъюнктивы

Материал забирать сухим стерильным ватным тампоном на пластиковой основе под местной анестезией (2 капли раствора декаина). Оттянув нижнее веко, вращательными движениями провести зонд 4-5 раз по конъюнктиве, захватывая внешний и внутренний углы глаза. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) поместить в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду,

аккуратно обломить пластиковый стержень и оставить рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Моча

У женщин для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер объемом 50–60 мл. Сбор мочи провести после тщательного туалета наружных половых органов. Желательно закладывать тампон во влагалище перед сбором материала для предупреждения контаминации мочи отделяемым из влагалища. Также не следует производить сбор мочи во время менструации.

У мужчин при мочеиспускании необходимо освободить наружное отверстие мочеиспускательного канала, полностью оттянув кожную складку. Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон на 50–60 мл.

Допускается хранение образцов мочи до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 °C до от минус 16 °C – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °C – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Секрет предстательной железы

Перед получением секрета предстательной железы головку полового члена обработать стерильным ватным тампоном. Секрет простаты забрать после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. После окончания массажа предстательной железы ее секрет в количестве 0,5–1 мл собрать в одноразовую стерильную сухую пластиковую пробирку объемом 2 мл или стерильный сухой контейнер объемом 50–60 мл.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части

крышки, и промаркировать.

При невозможности получить секрет сразу после массажа простаты, собрать первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 15–25 мл (см. порядок забора мочи).

Допускается хранение образцов секрета предстательной железы до проведения ПЦР-исследования:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 °С до от минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы мазков (соскобов) со слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы, образцы секрета предстательной железы не требуют предварительной подготовки.

Образцы мочи требуют предварительной подготовки. Флакон с мочой взболтать. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5 минут при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin). При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова концентрировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить супернатант, используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра, не захватывая осадок. К осадку добавить транспортную среду до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов мочи до проведения ПЦР-исследования:

- - при температуре от 2 до 8 °С — в течение 1 суток;
- - при температуре от минус 24 °С до от минус 16 °С — в течение 1 недели;
- - при температуре не выше минус 68 °С — длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Использование для проведения ПЦР-исследования биологического материала, содержащего избыточное количество примесей в виде слизи, крови, гноя и др. может приводить к ингибированию реакции амплификации. Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе

реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Непригодными для исследования являются образцы мочи и секрета предстательной железы, собранные ранее 24 часов от момента доставки в лабораторию.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

При проведении качественного ПЦР-исследования для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО», «АмплиПрайм ЭДЭМ» и другие рекомендованные Производителем. Порядок работы с комплектами реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм ЭДЭМ» смотрите в инструкции к используемому комплекту для экстракции, порядок работы с комплектом реагентов «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» смотрите в **приложении 1**.

При проведении количественного ПЦР-исследования для экстракции ДНК используются комплект реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» и другие рекомендованные Производителем. Порядок работы с комплектом реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» смотрите в инструкции к используемому комплекту для экстракции, порядок работы с комплектом реагентов «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» смотрите в **приложении 1**.

ВНИМАНИЕ! При проведении количественного ПЦР-исследования недопустимо использование комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ» и других экспресс-методов экстракции ДНК.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем ВКО-FL – 10 мкл в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОКО.

Объем элюции – 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L необходимо проводить элюцию ДНК в 250 мкл буфера для элюции В.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ»:

ВНИМАНИЕ! Добавление ВКО-FL в исследуемые образцы и контроли не требуется.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл транспортной среды ТС-ЭДЭМ.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 для амплификации фрагментов ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 4). Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
2. На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-буфера-К, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью *N. gonorrhoeae* /

***C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis*.**

3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

4. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

- а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K2 complex**.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО** (или из **транспортной среды ТС-ЭДЭМ**, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

Для количественного определения ДНК:

- а) **ДНК-калибратор K1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K1 complex**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K2 complex**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8, 9)⁸.

⁸ Программы амплификации (табл. 8, 9) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

Таблица 8

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁹ и планшетного¹⁰ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5.5, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 9

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

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	
	95	5 с		95	5 с	
3	60	20 с детекция флуоресц. сигнала	40	60	30 с детекция флуоресц. сигнала	40
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5.5 и Cy5.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного

⁹ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.
¹⁰ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

сигнала.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 5 каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК <i>T. vaginalis</i>	ДНК ВКО-FL

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

При проведении качественного исследования принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)					Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5	
отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> НЕ обнаружены
<u>определено</u>	отсутствует	отсутствует	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> обнаружена
отсутствует	<u>определено</u>	отсутствует	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>C. trachomatis</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	<u>определено</u>	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>M. genitalium</i> обнаружена

отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u>	не учитывается	ДНК <i>T. vaginalis</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат качественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 12 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов качественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

При проведении количественного исследования на основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора

реагентов «АмплиПрайм® NСMT» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 13

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении количественного ПЦР-исследования**

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или определено больше граничного, при этом значения <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5.5 отсутствуют. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5 определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i> не выявлена.
менее 2×10^3 ГЭ/мл ¹¹ (4×10^3 ГЭ/мл для образцов мочи)	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^3 ГЭ/мл для отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы; секрета предстательной железы. Результат выдается как результат менее 4×10^3 ГЭ/мл для образцов мочи.
менее 2×10^2 ГЭ/мл ¹² (4×10^2 ГЭ/мл для образцов мочи)	ДНК <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^2 ГЭ/мл для отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки ротоглотки, конъюнктивы; секрета предстательной железы. Результат выдается как результат менее 4×10^2 ГЭ/мл для образцов мочи.
$X \times 10^y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации $X \times 10^y$ ГЭ/мл.
более 1×10^7 ГЭ/мл	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат более 1×10^7 ГЭ/мл.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

¹¹ Для ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*

¹² Для ДНК *T. vaginalis*

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis*

Для биологического материала, содержащего клетки (отделяемое слизистых оболочек человека), полученные значения концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *N.g.* (*C.t.*, *M.g.*, *T.v.*) на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* производят согласно формуле:

$\frac{\text{число ГЭ } N.g. (C.t., M.g., T.v.) \text{ в 1 мл}}{\text{число ГЭ ДНК человека в 1 мл}}$	$\times 10^5 =$	$\text{число ГЭ } N.g. (C.t., M.g., T.v.) \text{ на } 10^5 \text{ клеток человека}$
---	-----------------	---

где:

- «число ГЭ *N.g.* (*C.t.*, *M.g.*, *T.v.*) в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *N.g.* (*C.t.*, *M.g.*, *T.v.*) в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

Результат количественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 14 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 14

**Результаты для контролей различных этапов
количественного ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K1	ПЦР	определено	определено	определено	определено	определено
K2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

- Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 12) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
- Для отрицательного контроля экстракции (OK):
 - по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
 - по каналу для флуорофора Cy5 значение порогового цикла (Ct) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что OK не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех

образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.

4. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 14). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К2 значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 14) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
6. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN для амплификации фрагментов ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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.

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется 10 мкл ПЦР-смеси *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis* и 5 мкл ПЦР-буфера-Н. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (см. контрольные реакции в п. 7) плюс запас на несколько реакций.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно

перед проведением ПЦР-исследования.

2. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis* и ПЦР-буфером-Н, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis* и ПЦР-буфера-Н, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

7. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

- а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K2 complex**.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО** (или из **транспортной среды ТС-ЭДЭМ**, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

Для количественного определения ДНК:

- а) **ДНК-калибратор K1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K1 complex**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K2 complex**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 15, 16)¹³.

Таблица 15

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹⁴ и планшетного¹⁵ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5.5, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 16

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Приборы роторного типа ¹⁴			Приборы планшетного типа ¹⁵		
	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	

¹³ Программы амплификации (табл. 15, 16) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

¹⁴ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

¹⁵ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX, Cy5.5 и Cy5**.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 5 каналам:

Таблица 17

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК <i>T. vaginalis</i>	ДНК ВКО-FL

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

При проведении качественного исследования принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 18

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении качественного ПЦР-исследования**

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)					Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5	
отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> НЕ обнаружены
<u>определено</u>	отсутствует	отсутствует	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> обнаружена
отсутствует	<u>определено</u>	отсутствует	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>C. trachomatis</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	<u>определено</u>	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>M. genitalium</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u>	не учитывается	ДНК <i>T. vaginalis</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат качественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 19 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 19

**Результаты для контролей различных этапов
качественного ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	определено меньше	определено меньше	определено меньше	определено меньше	определено меньше

		граничного	граничного	граничного	граничного	граничного
--	--	------------	------------	------------	------------	------------

При проведении количественного исследования на основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 20

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении количественного ПЦР-исследования**

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или определено больше граничного, при этом значения <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5.5 отсутствуют. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5 определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i> не выявлена.
менее 2×10^3 ГЭ/мл ¹⁶ (4×10^3 ГЭ/мл для образцов мочи)	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^3 ГЭ/мл для отделяемого слизистых оболочек уrogenитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы; секрета предстательной железы. Результат выдается как результат менее 4×10^3 ГЭ/мл для образцов мочи.
менее 2×10^2 ГЭ/мл ¹⁷ (4×10^2 ГЭ/мл для образцов мочи)	ДНК <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^2 ГЭ/мл для отделяемого слизистых оболочек уrogenитального тракта,

¹⁶ Для ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*

¹⁷ Для ДНК *T. vaginalis*

	прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы; секрета предстательной железы. Результат выдается как результат менее 4×10^2 ГЭ/мл для образцов мочи.
$X \times 10^y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации $X \times 10^y$ ГЭ/мл.
более 1×10^7 ГЭ/мл	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат более 1×10^7 ГЭ/мл.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis*

Для биологического материала, содержащего клетки (отделяемое слизистых оболочек человека), полученные значения концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *N.g.* (*C.t.*, *M.g.*, *T.v.*) на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* производят согласно формуле:

$\frac{\text{число ГЭ } N.g. (C.t., M.g., T.v.) \text{ в } 1 \text{ мл}}{\text{число ГЭ ДНК человека в } 1 \text{ мл}}$	$\times 10^5 =$	$\text{число ГЭ } N.g. (C.t., M.g., T.v.) \text{ на } 10^5 \text{ клеток человека}$
---	-----------------	---

где:

- «число ГЭ *N.g.* (*C.t.*, *M.g.*, *T.v.*) в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *N.g.* (*C.t.*, *M.g.*, *T.v.*) в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК

человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

Результат количественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 21 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 21

Результаты для контролей различных этапов количественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	определено	определено	определено	определено	определено
К2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

- Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 19) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
- Для отрицательного контроля экстракции (ОК)
 - по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
 - по каналу для флуорофора Cy5 значение порогового цикла (Ct) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил

- функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.
 4. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора K1 отсутствует значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 21). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 5. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора K2 значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 21) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 6. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 3 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L для амплификации фрагментов ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i> -Lyo	Порошок белого цвета	-	96 пробирок объемом 0,2 мл или 96-луночный планшет для ПЦР
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 96 реакций амплификации, включая контроли.

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок или достать 96-луночный планшет для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis*-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 3).
2. В подготовленные пробирки или лунки планшета внести по 25 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! При работе с планшетом, пробы ДНК и контрольные образцы добавлять аккуратно на дно лунки, не допуская образования капель на стенке.

3. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

- а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл K2 complex**.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО** (или из **транспортной среды ТС-ЭДЭМ**, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

Для количественного определения ДНК:

- а) **ДНК-калибратор K1** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл K1 complex**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл K2 complex**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку или лунку планшета с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К–**.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 22, 23)¹⁸.

¹⁸ Программы амплификации (табл. 22, 23) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

Таблица 22

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹⁹ и планшетного²⁰ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5.5, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 23

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Приборы роторного типа ¹⁹				Приборы планшетного типа ²⁰		
Цикл	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, Cy5.5 и Cy5.**

- Установить пробирки или планшет в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

¹⁹ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

²⁰ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 5 каналам:

Таблица 24

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК <i>T. vaginalis</i>	ДНК ВКО-FL

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

При проведении качественного исследования принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 25

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)					Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5	
отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> НЕ обнаружены
<u>определено</u>	отсутствует	отсутствует	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> обнаружена
отсутствует	<u>определено</u>	отсутствует	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>C. trachomatis</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	<u>определено</u>	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>M. genitalium</i> обнаружена

отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено	не учитывается	ДНК <i>T. vaginalis</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 26 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 26

Результаты для контролей различных этапов
качественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

При проведении количественного исследования на основании полученных значений порогового цикла (*Ct*) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора

реагентов «АмплиПрайм® NСMT» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 27

**Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении количественного ПЦР-исследования**

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение <i>Ct</i> по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или определено больше граничного, при этом значения <i>Ct</i> по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5.5 отсутствуют. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.
ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5 определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i> не выявлена.
менее 2×10^3 ГЭ/мл ²¹ (4×10^3 ГЭ/мл для образцов мочи)	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^3 ГЭ/мл для отделяемого слизистых оболочек влагалища, цервикального канала, уретры, ротоглотки, конъюнктивы; секрета предстательной железы. Результат выдается как результат менее 4×10^3 ГЭ/мл для образцов мочи.
менее 2×10^2 ГЭ/мл ²² (4×10^2 ГЭ/мл для образцов мочи)	ДНК <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^2 ГЭ/мл для отделяемого слизистых оболочек влагалища, цервикального канала, уретры, ротоглотки, конъюнктивы; секрета предстательной железы. Результат выдается как результат менее 4×10^2 ГЭ/мл для образцов мочи.
$X \times 10^Y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации $X \times 10^Y$ ГЭ/мл.
более 1×10^7 ГЭ/мл	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат более 1×10^7 ГЭ/мл.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

²¹ Для ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*

²² Для ДНК *T. vaginalis*

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis*

Для биологического материала, содержащего клетки (отделяемое слизистых оболочек человека), полученные значения концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *N.g.* (*C.t.*, *M.g.*, *T.v.*) на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентраций ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* необходимо проводить параллельное тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* производят согласно формуле:

$\frac{\text{число ГЭ } N.g. (C.t., M.g., T.v.) \text{ в } 1 \text{ мл}}{\text{число ГЭ ДНК человека в } 1 \text{ мл}}$	$\times 10^5 =$	$\text{число ГЭ } N.g. (C.t., M.g., T.v.) \text{ на } 10^5 \text{ клеток человека}$
---	-----------------	---

где:

- «число ГЭ *N.g.* (*C.t.*, *M.g.*, *T.v.*) в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *N.g.* (*C.t.*, *M.g.*, *T.v.*) в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

Результат количественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 28 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

**Результаты для контролей различных этапов
количественного ПЦР-исследования**

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Sy5.5	Sy5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K1	ПЦР	определено	определено	определено	определено	определено
K2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

- Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 26) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
- Для отрицательного контроля экстракции (OK)
 - по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Sy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
 - по каналу для флуорофора Sy5 значение порогового цикла (Ct) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что OK не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Sy5 и/или Sy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.

- образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.
4. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора K1 отсутствует значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 28). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 5. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора K2 значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 28) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 6. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
 7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 4 (комплекты реагентов «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN)

СОСТАВ

Комплект реагентов «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» вариант 100С – комплект реагентов для экстракции ДНК из биологического материала – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ²³	50	1 флакон
Компонент А-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,6	2 пробирки
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	13 пробирок
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN для амплификации фрагментов ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном и количественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
K1 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

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

²³ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

К набору реагентов прилагается диск, содержащий руководство оператора и программное обеспечение версии 1.0 в формате Microsoft Excel для автоматической обработки исходных данных и получения результатов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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.

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis*** и **5 мкл ПЦР-буфера-Н**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (см. контрольные реакции в п. 7) плюс запас на несколько реакций.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью ***N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis*** и ПЦР-буфером-Н, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси ***N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis*** и ПЦР-буфера-Н, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

7. Поставить контрольные реакции:

Для качественного определения ДНК:

- а) **положительный контроль ПЦР (K+)** – в пробирку с реакционной смесью

внести **10 мкл K2 complex**.

- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО** (или из **транспортной среды ТС-ЭДЭМ**, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

Для количественного определения ДНК:

- а) **ДНК-калибратор K1** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K1 complex**.
- б) **ДНК-калибратор K2** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K2 complex**.
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (K–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K–**.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 29, 30)²⁴.

Таблица 29

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного²⁵ и планшетного²⁶ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, JOE, ROX, Cy5.5, Cy5	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты

²⁴ Программы амплификации (табл. 29, 30) равнозначны в использовании для данного набора реагентов.

²⁵ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

²⁶ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

только для выявления ДНК возбудителя, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени.

Таблица 30

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Приборы роторного типа ²⁵			Приборы планшетного типа ²⁶		
	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, Cy5.5 и Cy5**.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору реагентов, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения.

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 5 каналам:

Таблица 31

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК <i>T. vaginalis</i>	ДНК ВКО-FL

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

При проведении качественного исследования принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 32

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного ПЦР-исследования

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)					Результат
FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5	
отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> НЕ обнаружены
<u>определено</u>	отсутствует	отсутствует	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> обнаружена
отсутствует	<u>определено</u>	отсутствует	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>C. trachomatis</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	<u>определено</u>	отсутствует	не учитывается	ДНК <i>M. genitalium</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	отсутствует	<u>определено</u>	не учитывается	ДНК <i>T. vaginalis</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат качественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 33 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 33

Результаты для контролей различных этапов
качественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

При проведении количественного исследования на основании полученных значений порогового цикла (Ct) и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходит автоматическое построение калибровочной прямой и расчет значений геномных эквивалентов ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* в 1 мл исследуемых и контрольных образцов.

ВНИМАНИЕ! Значения концентраций ДНК-калибраторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Допускается использование результатов, полученных для ДНК-калибраторов в предыдущей постановке, выполненной на данном приборе, для проведения последующих постановок с использованием данной серии набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT» путем экспорта полученных для ДНК-калибраторов результатов с помощью программного обеспечения прибора.

Таблица 34

Интерпретация результатов для исследуемых образцов
при проведении количественного ПЦР-исследования

Заключение	Расшифровка
Невалидный	Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или определено больше граничного, при этом значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX, Cy5.5 отсутствуют. Требуется повторное ПЦР-исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> не выявлена	Значение <i>Ct</i> для ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5 определено значение <i>Ct</i> меньше граничного. Результат выдается как ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i> не выявлена.
менее 2×10^3 ГЭ/мл ²⁷ (4×10^3 ГЭ/мл для образцов мочи)	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^3 ГЭ/мл для отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы; секрета предстательной железы. Результат выдается как результат менее 4×10^3 ГЭ/мл для образцов мочи.
менее 2×10^2 ГЭ/мл ²⁸ (4×10^2 ГЭ/мл для образцов мочи)	ДНК <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат менее 2×10^2 ГЭ/мл для отделяемого слизистых оболочек влагалища, цервикального канала, уретры, ротоглотки, конъюнктивы; секрета предстательной железы. Результат выдается как результат менее 4×10^2 ГЭ/мл для образцов мочи.
$X \times 10^Y$ ГЭ/мл	Рассчитанное значение концентрации (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> / <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> / <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации $X \times 10^Y$ ГЭ/мл.
более 1×10^7 ГЭ/мл	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора реагентов. Результат выдается как результат более 1×10^7 ГЭ/мл.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Относительные (нормированные) значения концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis*

Для биологического материала, содержащего клетки (отделяемое слизистых оболочек человека), полученные значения концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* могут быть нормированы на стандартное количество клеток человека (число ГЭ *N.g.* (*C.t.*, *M.g.*, *T.v.*) на 10^5 клеток человека). Нормированные значения концентраций отражают количество клеток возбудителя относительно клеток человека. Кроме того, значение концентрации ДНК человека позволяет оценить качество взятия биологического материала.

Для расчета нормированных значений концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* необходимо проводить параллельное

²⁷ Для ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*

²⁸ Для ДНК *T. vaginalis*

тестирование проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов, с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT» и набора реагентов для количественного определения ДНК человека, рекомендованных Производителем. Расчет нормированных значений концентрации ДНК *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* производят согласно формуле:

$$\frac{\text{число ГЭ } N.g. (C.t., M.g., T.v.) \text{ в 1 мл}}{\text{число ГЭ ДНК человека в 1 мл}} \times 10^5 = \frac{\text{число ГЭ } N.g. (C.t., M.g., T.v.)}{\text{на } 10^5 \text{ клеток человека}}$$

где:

- «число ГЭ *N.g. (C.t., M.g., T.v.)* в 1 мл» – рассчитанные абсолютные значения количества ГЭ *N.g. (C.t., M.g., T.v.)* в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT»;
- «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» – рассчитанное значение количества ГЭ ДНК человека в 1 мл исследуемого образца при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

ВНИМАНИЕ! Подробную информацию по расчету значения «число ГЭ ДНК человека в 1 мл» смотрите в инструкции по применению набора реагентов для количественного определения ДНК человека.

Результат количественного ПЦР-исследования считать достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 35 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 35

Результаты для контролей различных этапов количественного ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)				
		FAM	JOE	ROX	Cy5.5	Cy5
ОК	Экстракция ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	определено меньше граничного
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует
К1	ПЦР	определено	определено	определено	определено	определено
К2	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (C_t) по любому из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 33) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК)
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
 - б) по каналу для флуорофора Cy5 значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.
4. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К1 отсутствует значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 35). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
5. При проведении количественного ПЦР-исследования для ДНК-калибратора К2 значение порогового цикла (C_t) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 35) отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.



6. При проведении количественного ПЦР-исследования показатель эффективности E при построении калибровочной прямой менее 80 % или более 120 %. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
7. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут. Комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО», «ПЦР-комплект» вариант FRT-100, вариант FRT-100 FN при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-К. ПЦР-буфер-К хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis* хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н. ПЦР-буфер-Н хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis* хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 3. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis*-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Форма комплектации 4. Комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» хранить при температуре от 2 до 25 °С, кроме ВКО-FL. ВКО-FL хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 FN хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-Н. ПЦР-буфер-Н хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis* / *M. genitalium* / *T. vaginalis* хранить в защищенном от света месте.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиПрайм® NCMT» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио» (111394 г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2) в отдел по работе с рекламациями (тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru).



При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Максимальное
число тестов



Код партии



Использовать до



Изделие для in vitro
диагностики



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Дата изменения



Не допускать
попадания
солнечного света



Ограничение
температуры



Дата изготовления



Производитель



Беречь от влаги



Хрупкое. Осторожно



Верх

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК из исследуемых образцов с использованием комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»

ВНИМАНИЕ! При использовании автоматической станции для экстракции детальная информация по процедуре экстракции ДНК из биологических образцов изложена в инструкции по использованию автоматической станции.

Порядок работы

ВНИМАНИЕ! Лизирующий раствор МАГНО-сорб имеет неприятный запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

1. Прогреть **лизирующий раствор МАГНО-сорб** при температуре **60 °С** до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции, если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования). Промаркировать.
3. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл **ВКО-FL**, компонент **А-1** и **магнетизированную силику** из расчета на один образец: **10 мкл ВКО-FL**, **10 мкл компонента А-1** и **10 мкл магнетизированной силики**²⁹. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на один образец больше, например:

Количество образцов для экстракции ДНК	ВКО-FL, мкл	Компонент А-1, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	70
12	130	130	130
18	190	190	190
24	250	250	250

4. Внести в пробирки объемом 1,5 мл по **30 мкл** подготовленной смеси **ВКО-FL**, компонента **А-1** и **магнетизированной силики**.
5. Добавить в пробирки по **450 мкл** **лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
6. Внести в подготовленные пробирки по **100 мкл** исследуемых образцов.
7. В пробирку отрицательного контроля (**ОК**) экстракции внести **100 мкл ОКО**.
8. Плотнo закрыть крышки, перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **10 мин**.
9. Осадить капли на вортексе и перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
10. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.

²⁹ Предварительное смешивание ВКО-FL, компонента А-1 и магнетизированной силики позволяет упростить процедуру экстракции. Возможно раздельное внесение этих реагентов.

11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 7**, плотно закрыть крышки.
12. Смыть магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, затем осадить капли на вортексе.
13. Переставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив на **1 мин.**
14. Отобрать надосадочную жидкость, аналогично п. 10. Перенести пробирки в обычный штатив.
15. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**
16. Добавить в пробирки по **100 мкл буфера для элюции В**, перемешать на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L необходимо проводить элюцию ДНК в **250 мкл буфера для элюции В**.

17. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **5 мин.**
18. Осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив на **2 мин.** Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных ДНК для проведения ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для этого необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

Пронумеровано, прошито и скреплено

65 лист (л/ов)

Руководитель Общества с ограниченной
ответственностью «НекстБио» –

Генеральный директор Управляющей
компаний ООО «МБК»

Д.Л. Симачева

