

УТВЕРЖДАЮ

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

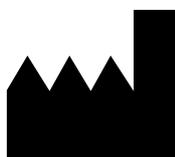

В.В. Малеев
«19» *Июль* 2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для определения рРНК *Chlamydia trachomatis*
в клиническом материале с помощью реакции
транскрипционной амплификации (НАСБА) в режиме
«реального времени»
для диагностики in vitro

«АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

НАЗНАЧЕНИЕ.

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

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

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

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

Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

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

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

Набор реагентов рассчитан на 60 тестов, включая контроли.

СОСТАВ.

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

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Лизирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость*	27	1 флакон
Отмывочный буфер	Прозрачная бесцветная жидкость*	44	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон

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

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	2 флакона
Сорбент	Суспензия белого цвета	0,8	2 пробирки
РНК-элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	2 пробирки

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

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

Реактив	Описание	Объем (мл) Масса (мг)	Кол-во
Гранула с ферментами	Гранула белого цвета	5,0 мг	6 штук
Растворитель ферментов	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5 мл	1 пробирка
Гранула с реагентами	Гранула белого цвета	6,5 мг	6 штук
Растворитель реагентов	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6 мл	1 пробирка
Раствор KCl	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5 мл	1 пробирка
DEPC-H₂O	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5 мл	1 пробирка
СТ-Mix	Прозрачная розовая жидкость	0,05 мл	1 пробирка
ПКО СТ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

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

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

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

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Для проведения анализа используется следующий материал:

– **соскоб эпителиальных клеток из урогенитального тракта женщин**

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

Уретра. Перед взятием соскоба из уретры необходимо обработать ее наружное отверстие тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором (0,9 % раствор NaCl). Производят массаж уретры пальцем со стороны влагалища, прижимая ее к лобковой кости. Вводят зонд в уретру на глубину 1-1,5 см и аккуратно, не поранив слизистую, несколькими вращательными движениями производят соскоб эпителиальных клеток и переносят зонд в пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в пробирку с 500 мкл транспортной среды для мазков, вращают зонд в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку. Для выделения нуклеиновых кислот используется 100 мкл образца.

– **соскоб эпителиальных клеток из уретры мужчин**

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

Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку. Для выделения нуклеиновых кислот используется 100 мкл образца.

– **моча**

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20-40 мл в сухой стерильный флакон или сухую стерильную пробирку. Взбалтывают флакон с мочой. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин при 10 тыс g (12 тыс об/мин на центрифуге). Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удаляют надосадочную жидкость, не захватывая осадок. К осадку добавляют транспортную среду до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе. При экстракции из 1000 мкл мочи с помощью автоматической станции Nuclisens® EasyMAG™ (BioMérieux, Франция) концентрирование мочи не проводят.

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

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 следует 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, 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.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹. 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

¹ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

работы в клинико-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 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 вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. 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 формы комплектации, не включающей комплект реагентов «РИБОТЕСТ-сорб»)

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 «РИБОТЕСТ-сорб»)

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.

УТИЛИЗАЦИЯ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, 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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ НАСБА В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

ЗОНА 1.

Для этапа выделения нуклеиновых кислот из клинического материала требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс безопасности II тип А).
2. Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных и механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).

5. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
7. Холодильник от 2 до 8 °С.
8. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
9. Емкость с дезинфицирующим раствором.
10. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
11. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «Elmi», Латвия; «Hettish», Германия).
12. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
13. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
14. Штатив для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Ахуген», США).

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

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

ЗОНА 2.

Для проведения НАСБА в режиме «реального времени» требуются:

1. Анализатор и программное обеспечение «NucliSens® EasyQ» («bioMérieux», Франция), «Rotor-Gene» 3000/6000 («CorbettResearch», Австралия) или «iQ iCycler» и «iQ5» («BioRad», США).

2. Инкубатор «NucliSens[®] EasyQ» («bioMérieux», Франция).
3. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-»Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Набор электронных и механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Штатив-контейнер для пробирок 0,2 мл с крышкой («bioMérieux», Франция).
7. Устройство для закрывания пробирок («bioMérieux», Франция).
8. Стрипованные пробирки (например, PCR -0208-С, «Ахуген», США).
9. Стрипованные крышки (например, PCR-02CP-С, «Ахуген», США).
10. Мини-центрифуга для стрипованных пробирок (\pm 6 000 об/мин, 2 000 g) («bioMérieux», Франция).
11. Центрифуга для пробирок на 1,5 мл (до 10 000 g) (например, «Elmi», Латвия, «Hettish», Германия).
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.
14. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ ПРОБ.

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

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

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

Порядок работы.

1. До начала процедуры прогрейте флаконы с **лизирующим буфером** и **отмывочным буфером** при температуре 25-37 °С до полного растворения кристаллов. В процессе прогрева периодически перемешивайте флаконы. Убедитесь, что кристаллы лизирующего буфера и отмывочного буфера полностью растворились. Охладите до комнатной температуры.
2. Подготовьте необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль выделения). Внесите на стенку пробирок по **10 мкл ВКО СТ-гес**. Затем внесите по **400 мкл лизирующего буфера**. Промаркируйте пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим буфером** и **ВКО СТ-гес** внесите по **100 мкл проб**, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внесите **100 мкл транспортной среды для мазков**. Закройте пробирки после внесения образца.
4. Плотнo закрытые пробирки тщательно перемешайте на вортeксе и центрифугируйте в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.
5. Тщательно ресуспендируйте **сорбент** на вортeксе. В каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером добавьте по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента**. Закройте пробирки и перемешайте их на вортeксе.
6. Оставьте пробирки на 10 мин при комнатной температуре. Во избежание оседания частиц сорбента на дно пробирки регулярно (каждые 2 мин) перемешивайте.
7. Центрифугируйте пробирки для осаждения сорбента 30 с при 10 тыс об/мин. Удалите надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя. Используйте отдельный наконечник без аэрозольного барьера для каждой пробы.
8. Добавьте по **500 мкл отмывочного буфера** в каждую пробирку. Перемешайте на вортeксе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугируйте 30 с при 10 тыс об/мин. Удалите надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя. Используйте отдельный

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

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» МЕТОДОМ НАСБА.

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения амплификации).

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

I. Приготовление рабочих растворов реагентов на 10 реакций.

(При постановке большего количества проб реактивы рекомендуется объединить).

Порядок работы:

1. Перенесите пробирки с образцами прошедшими пробоподготовку в помещение для амплификации.
2. Включите анализатор («NucliSens[®] EasyQ», «Rotor-Gene» 3000/6000 или «iCycler iQ» и «iCycler iQ5») дайте ему как минимум 15 мин прогреться.
3. Создайте или выберите протокол анализа как описано в Приложении 2 для «NucliSens[®] EasyQ», в Приложении 3 для «iCycler iQ» и «iCycler iQ5» или в Приложении 4 для «Rotor-Gene» 3000/6000.
4. Перед добавлением всех реагентов их необходимо разморозить, перемешать и осадить капли со стенок пробирок центрифугированием в течение 3 с.
5. Приготовьте раствор ферментов. Добавьте **50 мкл растворителя ферментов к одной грануле с ферментами**. Оставьте на 10-15 мин при комнатной температуре. Перемешайте раствор ферментов потряхиванием. **Не используйте вортекс!** Осадите капли центрифугированием в течение 3 с. Используйте полученный раствор в течение 1 ч.

ВНИМАНИЕ! Прежде, чем открыть пробирку с лиофилизированным содержимым, убедитесь, что содержимое пробирки не размазано по стенкам (находится компактно на дне пробирки).

6. Приготовьте **Смесь-1** (после добавления каждого компонента немедленно хорошо перемешайте на вортексе): последовательно добавьте к **одной грануле с реагентами 70 мкл растворителя реагентов, 8 мкл DEPC-H₂O и 16 мкл раствора KCl**. **Не центрифугируйте полученный раствор!**
7. Приготовьте **Смесь-2**: добавьте **8 мкл СТ-Mix к Смеси-1**. Перемешайте на вортексе. Используйте в течение 30 мин после приготовления. **Не центрифугируйте!**
Если полученная **Смесь-2** не прозрачная, выдержите при

температуре 65 °С в течение 5 мин и снова перемешайте на вортексе. **Не используйте раствор с осадком!**

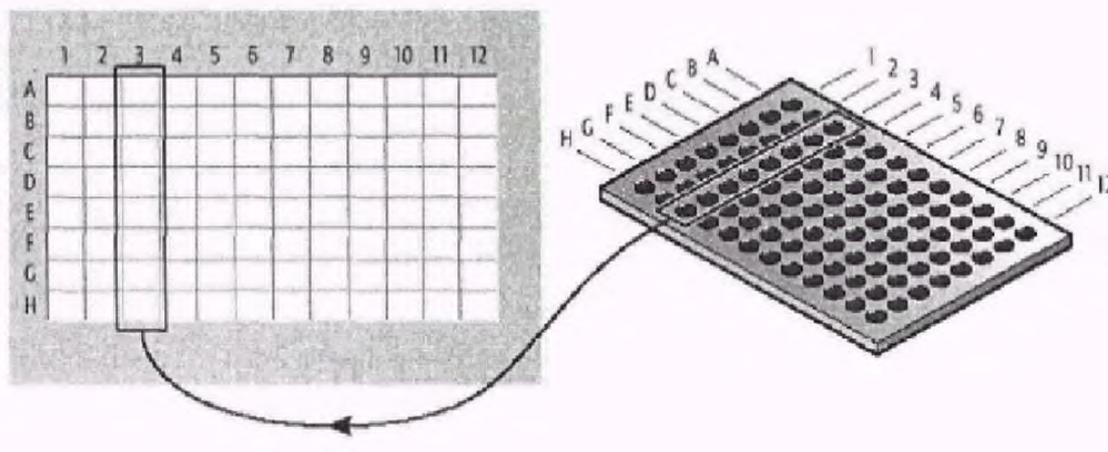
Готовый раствор ферментов можно хранить в течение 2 нед при температуре не выше минус 68 °С при условии, что раствор заморожен сразу после приготовления. Повторно замораживать раствор нельзя. **Смесь-1 и Смесь-2 хранению не подлежат!**

II. Проведение амплификации.

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

Порядок работы.

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



2. Перенос экстракта:

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

3. Поставьте контрольные реакции амплификации:
 - а) **положительный контроль (К+)** – внести 5 мкл ПКО СТ
 - б) **отрицательный контроль (К-)** – внести 5 мкл DEPC-H₂O
4. В каждую пробирку стрипа (содержащую 5 мкл экстракта РНК) внесите на дно 10 мкл Смеси-2. Визуально проверьте, что Смесь-2 была добавлена во все пробирки.
5. Поместите штатив в инкубатор «NucliSens® EasyQ». Убедитесь, что инкубатор прогрелся до температуры 65°C и установлена программа:

65 °C	– 2 мин
41 °C	– 2 мин
hold	– 41°C

Накройте штатив крышкой (**крышку инкубатора не закрывать!**) и инкубируйте по заданной программе.
6. В это время поместите необходимое количество крышек для пробирок в другой штатив дном вниз и внесите на внутреннюю поверхность крышек по **5 мкл раствора ферментов**.
7. По окончании второго этапа инкубации (2 мин при температуре 41 °C) не вынимая пробирки из инкубатора аккуратно закройте их крышками с раствором ферментов, используя устройство для закрывания пробирок.
8. Пометьте каждый стрип. Убедитесь, что крышки находятся в правильном порядке (щель в стрипе с крышками направлена к нумерованной стороне штатива). Визуально проверьте, что все пробирки тщательно закрыты.
9. Перенесите стрипы в мини-центрифугу для стрипов. Центрифугируйте пробирки 2 с.
10. Перемешайте, постукивая пальцами по пробиркам, и повторите центрифугирование. Убедитесь, что реактивы во всех пробирках тщательно перемешаны.
11. Немедленно верните пробирки в инкубатор в соответствующее положение до тех пор, пока процедура добавления раствора ферментов и перемешивания не будет выполнена для всех стрипов.
12. В течение 5 мин после добавления ферментов перенесите штатив со стрипами в предварительно прогретый до температуры 41 °C анализатор «NucliSens® EasyQ» или «iCycler iQ» и «iCycler iQ5» и начните амплификацию (См.

приложение 2 для «NucliSens[®] EasyQ», приложение 3 для «iCycler iQ» и «iCycler iQ5»). **Не открывайте анализатор в ходе амплификации!**

13. По окончании амплификации осторожно выньте штатив и сбросьте пробирки в закрывающийся контейнер. Убедитесь, что пробирки не открылись в ходе амплификации.
14. Проведите анализ результатов (см. приложение 2 для «NucliSens[®] EasyQ», приложение 3 для «iQ iCycler» и «iQ5»).

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

Порядок работы.

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

65 °С	– 2 мин
41 °С	– 2 мин
hold	– 41 °С

Накройте штатив крышкой (**крышку инкубатора не закрывать!**) и инкубируйте по заданной программе.
6. По окончании второго этапа инкубации (2 мин при температуре 41 °С) оставьте пробирки в инкубаторе при температуре 41 °С и внесите на стенки пробирок по 5 мкл раствора ферментов. Аккуратно закройте их.
7. Как можно быстрее (чтобы содержимое пробирок не успело

остыть и в течение 5 мин после внесения ферментов) установите пробирки в ротор и закрепите его в приборе. Закройте крышку и запустите программу амплификации (см. приложение 4).

8. По окончании амплификации осторожно сбросьте пробирки в закрывающийся контейнер. Убедитесь, что пробирки не открылись в ходе амплификации.
9. Проведите анализ результатов (см. приложение 4).

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду, колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20 - 24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 6 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-РИБОТЕСТ» направлять в отдел рекламаций, организации обучения и контроля качества по адресу 115035, г. Москва, ул. Садовническая, д. 20/13, стр. 2 (тел. (495) 664-28-84, факс (495) 664-28-89, e-mail: cs@ilslab.ru)².

Заведующий НПЛ ОМДиЭ



Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

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

Порядок работы.

Вариант 1. Выделение нуклеиновых кислот из 100 мкл отделяемого уретры, цервикального канала, влагалища с лизисом образца вне прибора.

1. Включить прибор «NucliSens® easyMAG™» и подготовить его к выделению нуклеиновых кислот, следуя инструкции к прибору.
2. В соответствующем окне программного обеспечения прибора заполнить таблицу исследуемых образцов. Ввести для каждого образца следующие параметры:
 - Поле Sample ID – задать название образца;
 - Поле Request – оставить без изменений;
 - Поле Volume – указать **100 мкл**;
 - Поле Eluate – указать **55 мкл**;
 - Поле Type – отметить **Lysed**;
 - Поле Priority – отметить **Normal**;
 - Поле Matrix – выбрать **Other**.

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

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

отдельным наконечником с аэрозольным барьером, тщательно перемешать пипетированием. В пробирку отрицательного контроля внести **100 мкл транспортной среды для мазков**, тщательно перемешать пипетированием.

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

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

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

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

1. Включить прибор «NucliSens[®] easyMAG[™]» и подготовить его к выделению нуклеиновых кислот, следуя инструкции к прибору.
2. В соответствующем окне программного обеспечения прибора заполнить таблицу исследуемых образцов. Ввести для каждого образца следующие параметры:
 - Поле Sample ID – задать название образца;
 - Поле Request – оставить без изменений;
 - Поле Volume – указать **100 мкл**;

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

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

7. Поместить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения нуклеиновых кислот согласно режиму On-board  («Лизис в приборе»).
8. По окончании инкубации ресуспендировать пробирку с магнитной силикой NucliSens, интенсивно перемешав ее содержимое на вортексе. Открыть крышку прибора и в каждую пробирку с образцом внести отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики**, тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
9. Закрыть крышку прибора и продолжить выделение нуклеиновых кислот нажав .
10. После окончания выделения нуклеиновых кислот, извлечь пробирки из прибора. Надсадочная жидкость содержит очищенные нуклеиновые кислоты. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

Примечание - Во избежание попадания магнитной силики в

очищенный раствор нуклеиновых кислот надосадочную жидкость необходимо перенести в стерильные пробирки в течение 30 мин после выделения.

Вариант 3. Выделение нуклеиновых кислот из 1000 мкл первой порции мочи с лизисом образца в приборе.

1. Включить прибор «NucliSens[®] easyMAG[™]» и подготовить его к выделению нуклеиновых кислот, следуя инструкции к прибору.
2. В соответствующем окне программного обеспечения прибора заполнить таблицу исследуемых образцов. Ввести для каждого образца следующие параметры:
 - Поле Sample ID – задать название образца;
 - Поле Request – оставить без изменений;
 - Поле Volume – указать **1000 мкл**;
 - Поле Eluate – указать **55 мкл**;
 - Поле Type – отметить **Primary**;
 - Поле Priority – отметить **Normal**;
 - Поле Matrix – выбрать **Other**.
3. Создать новый протокол выделения нуклеиновых кислот и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в режиме **On-board** («Лизис в приборе»): On-board Lysis Buffer Dispensing-**YES**, On-board Lysis Incubation-**YES**).
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. В пробирки, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот в приборе «NucliSens[®] easyMAG[™]», внести на стенку по **10 мкл ВКО СТ-rec**.
6. В каждую пробирку добавить **1000 мкл** исследуемой мочи отдельным наконечником с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля внести **1000 мкл транспортной среды для мазков**.
7. Поместить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу выделения нуклеиновых кислот согласно режиму On-board  («Лизис в приборе»).
8. По окончании инкубации ресуспендировать пробирку с магнитной силикой NucliSens, интенсивно перемешав ее содержимое на вортексе. Открыть крышку прибора и в

каждую пробирку с образцом внести отдельным наконечником с аэрозольным барьером по **25 мкл магнитной силики**, тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.

9. Закрыть крышку прибора и продолжить выделение нуклеиновых кислот нажав 

10. После окончания выделения нуклеиновых кислот, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенные нуклеиновые кислоты. Пробы готовы к постановке реакции амплификации.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

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

1. Ввод данных образца.

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

Номер образца Значения объемов

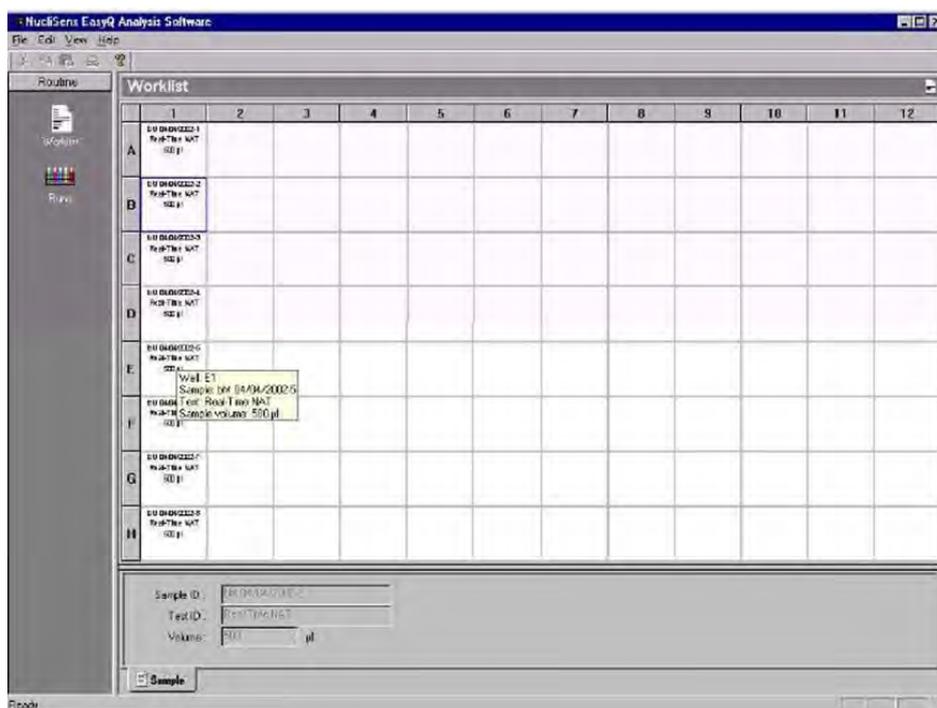
Название теста

Количество образцов

Well	Sample ID	Volume (ul)	Name of this Run:
A1	NC	5	Demo
B1	Sample 1	5	
C1	Sample 2	5	
D1	Sample 3	5	
E1	Sample 4	5	
F1	NC	5	
G1	PC	5	
H1	Empty	0	

2. Импорт данных.

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

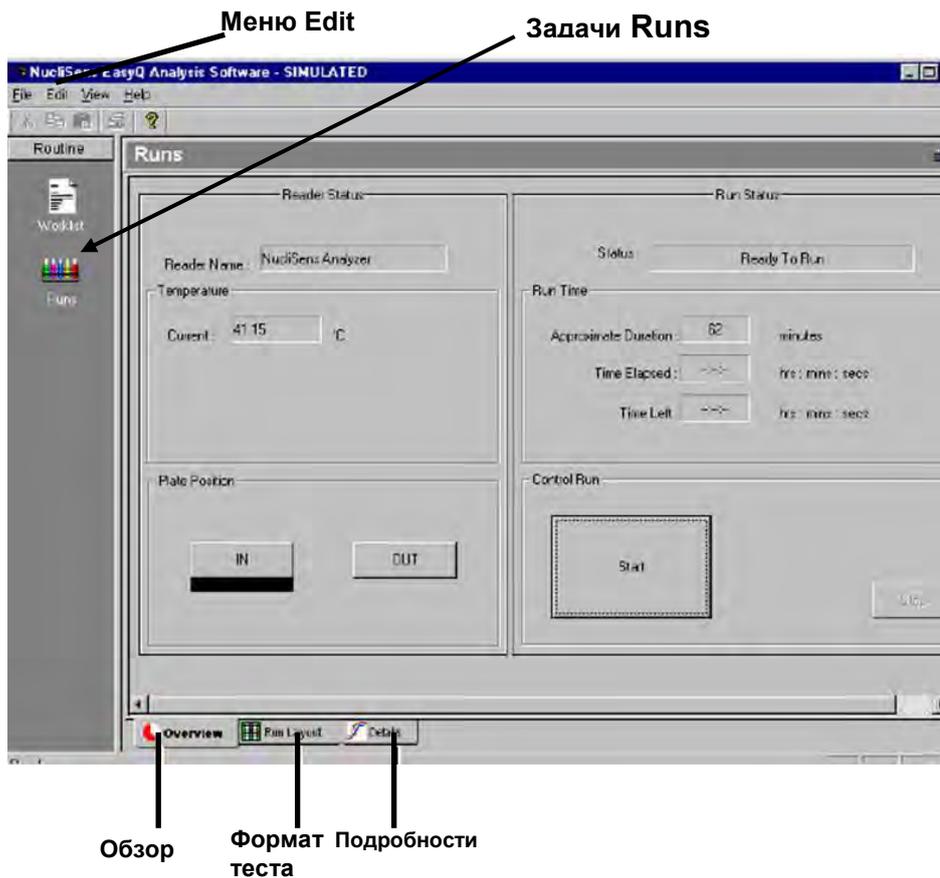


3. Выполнение теста.

Перейдите к задаче Runs, которая включает в себя:

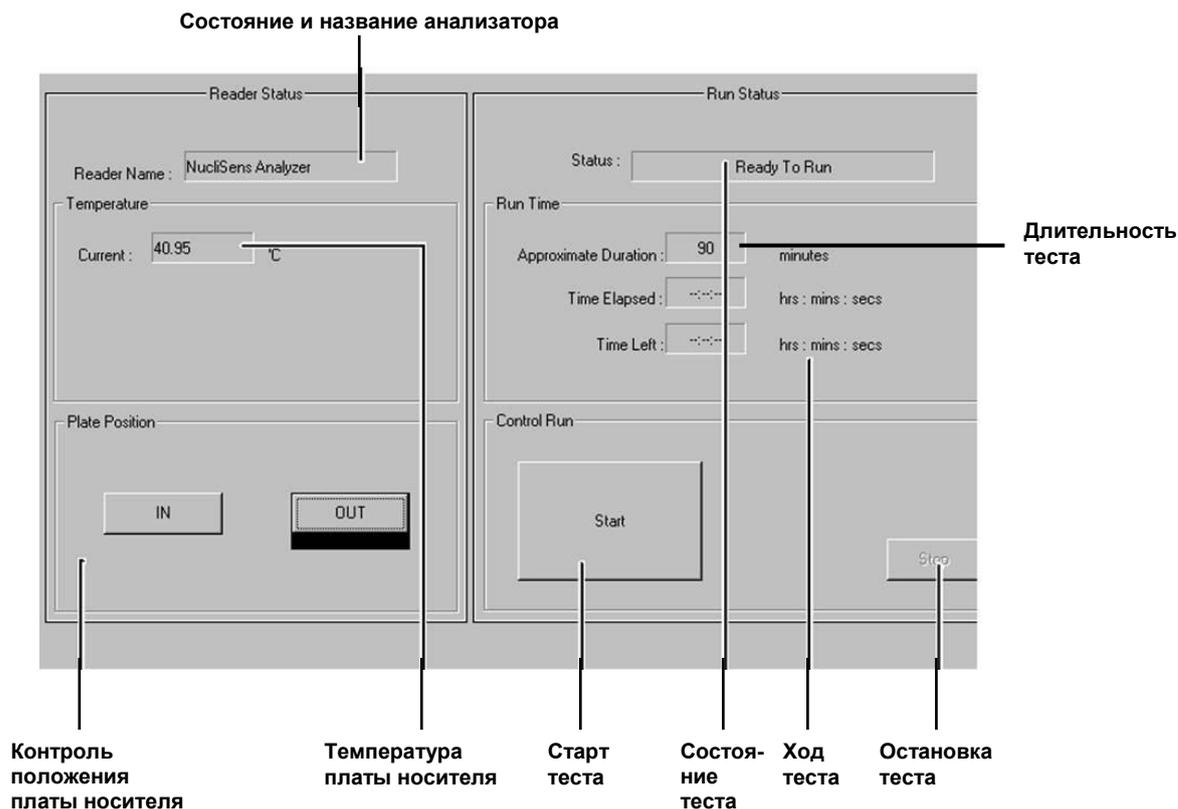
- Overview (обзор)
- Run layout (формат теста)
- Details (подробности)

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



До начала процедуры амплификации проведите следующие проверки:

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



ЗАПУСК ПРИБОРА.

Далее (после завершения инкубации).

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

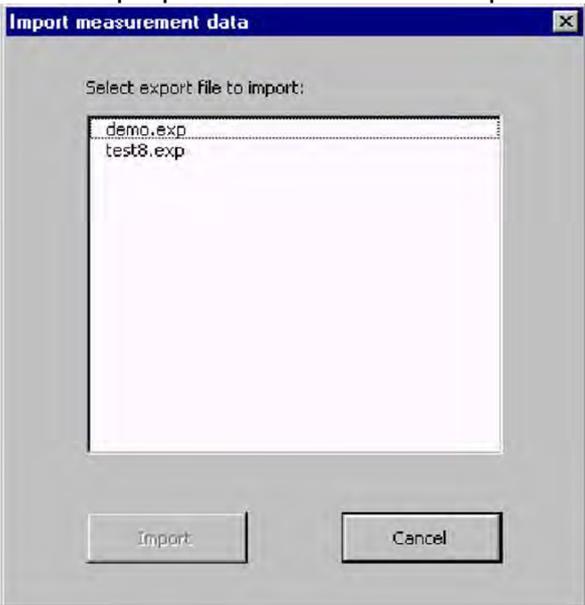
В ходе выполнения теста вы можете следить за его ходом в

подменю Обзор (Overview). Характеристики экспериментальных кривых можно наблюдать в подменю Подробности (Details).

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

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Импорт данных.

Шаг	Действие
1	<p>Выберете рабочий журнал NucliSens EasyQ Data Analyzer. Появится диалоговое окно с запросом, желаете ли вы воспользоваться макросами. Нажмите кнопку Enable Macro`s (Включить макросы).</p> <p>Результат: Откроется Excel с рабочим журналом NucliSens EasyQ Data Analyzer</p>
2	<p>В окне графического листа выберите задачу Import (импорт)</p>  <p>Результат: Появится диалоговое окно импорта измеренных данных</p>
3	<p>Выберите файл для импорта</p>
4	<p>Нажмите Import</p> <p>Результат: В окне графического листа появляется кнопка Print, и на экране высвечиваются рассчитанные необработанные данные. Результаты автоматически запоминаются</p>
5	<p>В окне графического листа введите порог определения: Threshold WT – 1.180, Threshold SC – 1.110 после чего нажмите Enter (Ввод). Помните, что программа воспринимает точку как десятичный разделитель!</p> <p>Результат: Данные немедленно пересчитываются и выводятся на экран.</p>
6	<p>Выберите лист General sheet и введите имя оператора в желтое поле ввода. Длина имени должна быть не более 8 символов</p>

7	Выберите Graphic sheet и нажмите кнопку Print в окне графического листа.
8	Выберите File > Save As..>, выберите директорию и имя файла, после чего выберите > Save (сохранить)
9	Закройте рабочий журнал the NucliSens EasyQ Data Analyzer

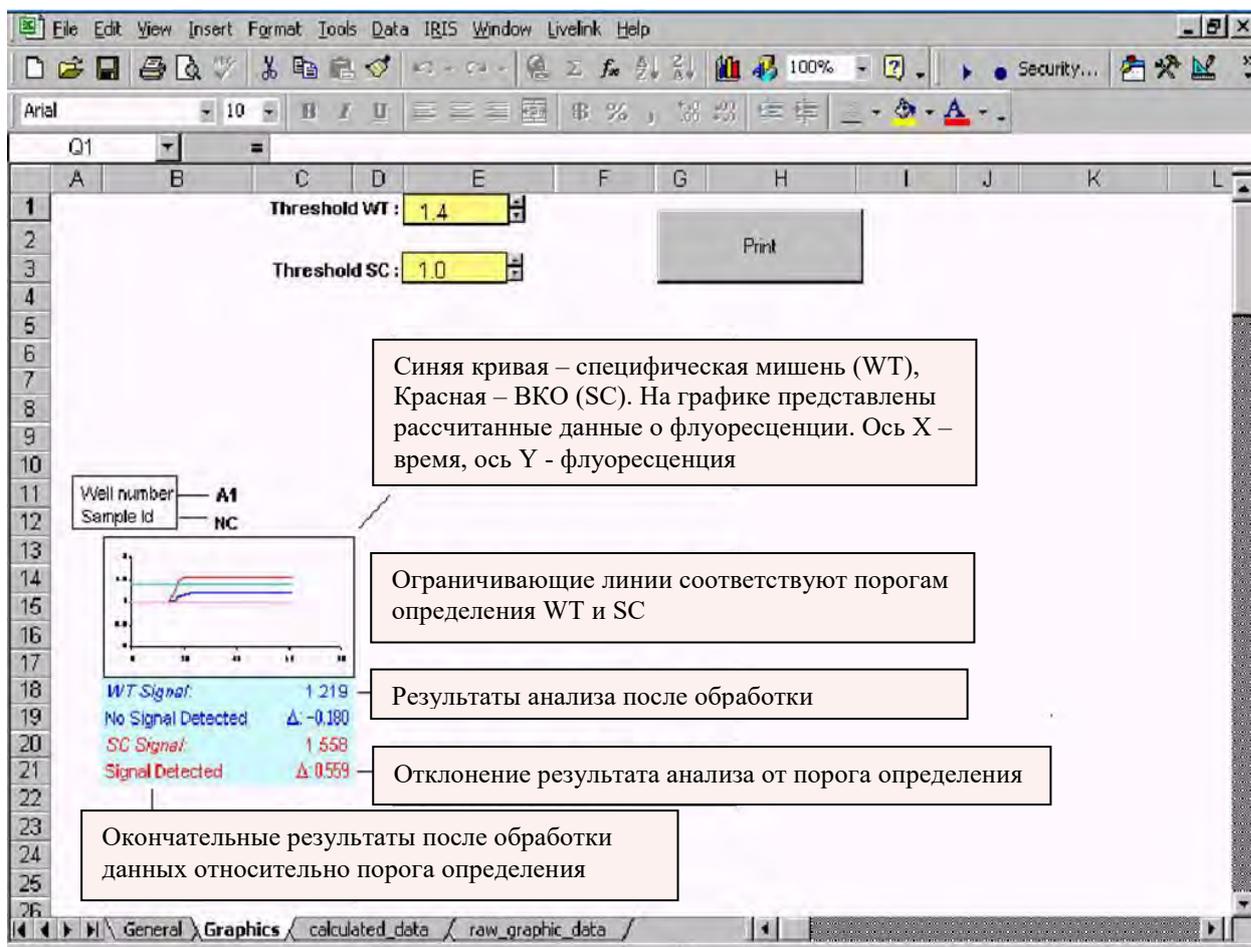
4. Выключение системы

Если анализатор в течение 3 мин не получает команд, он автоматически переключается в дежурный режим. При этом лампа гаснет, но температура платы-носителя поддерживается на уровне, предусмотренном по умолчанию. Рекомендуется выключать систему в конце каждого рабочего дня, а также по окончании всех тестов. Для выключения анализатора выполните следующие действия.

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

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

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

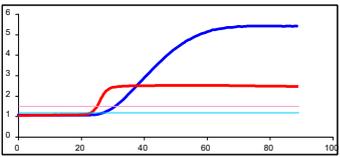
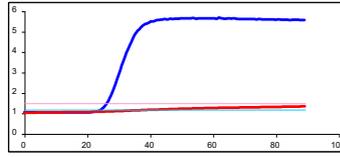
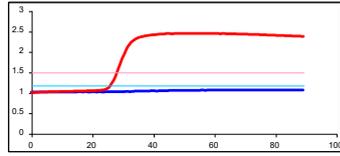
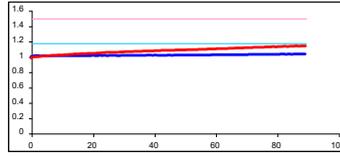


Положительный и отрицательный результаты.

Если величины флуоресценции выше пороговых значений (в строке отклонения результата анализа отображается как **Signal Detected**), результат интерпретируется как положительный. Порог определения определяется как уровень флуоресценции на границе положительного и отрицательного результата. Если величины флуоресценции ниже порога определения (в строке отклонения результата анализа отображается как **No Signal Detected**) результат интерпретируется как отрицательный. Порог определения был установлен при анализе выборки отрицательных образцов.

Таблица 1.

Оценка результатов анализа

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

Результаты не подлежат учету:

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

повторите тест с этапа амплификации РНК.

Возможные ошибки:

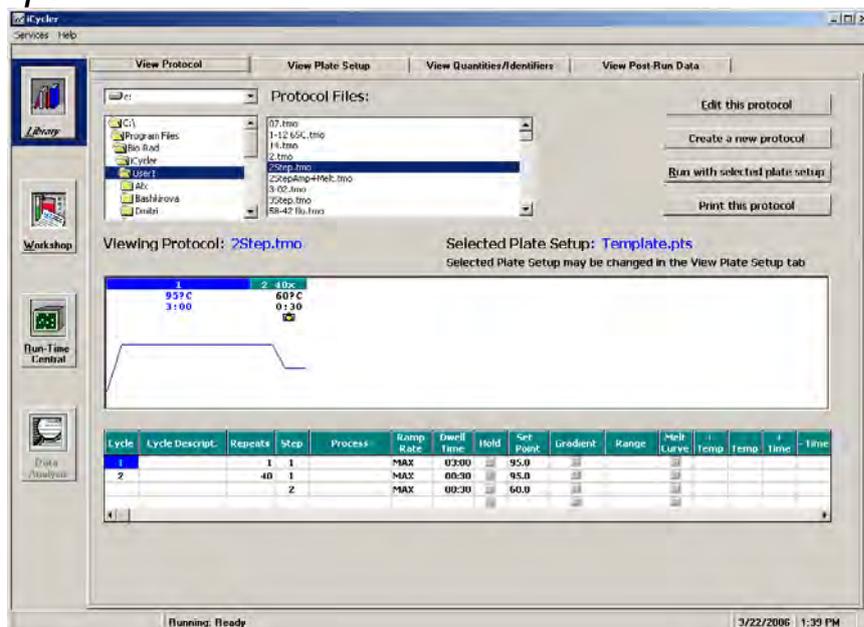
Отсутствие сигнала по каналу SC как в клинических образцах, так и в отрицательном контроле выделения (OK), а также, отсутствие сигнала по каналу WT в положительном контроле амплификации (K+) могут быть вызваны:

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 3.

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

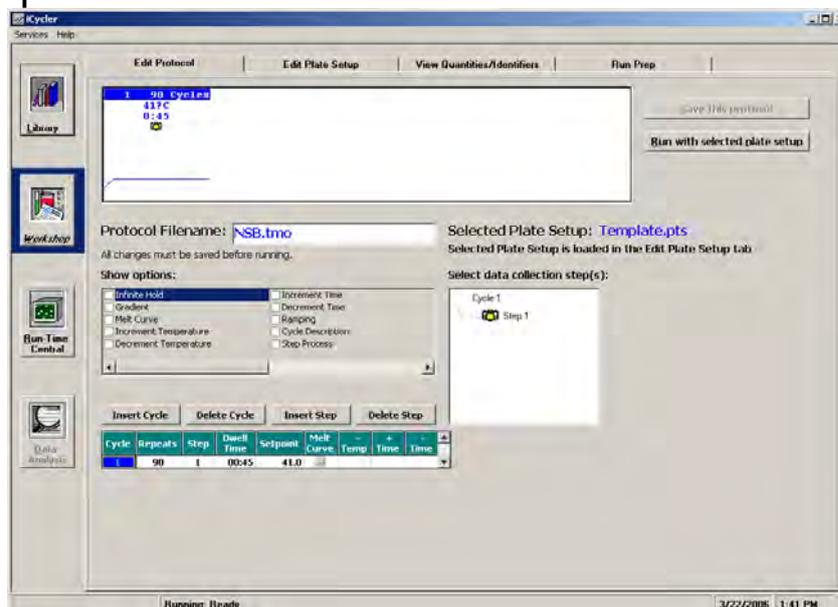
1. Запрограммируйте прибор для выполнения программы «41-90» нажав клавишу *Create a new protocol*, перейдя в задачи *Workshop*.



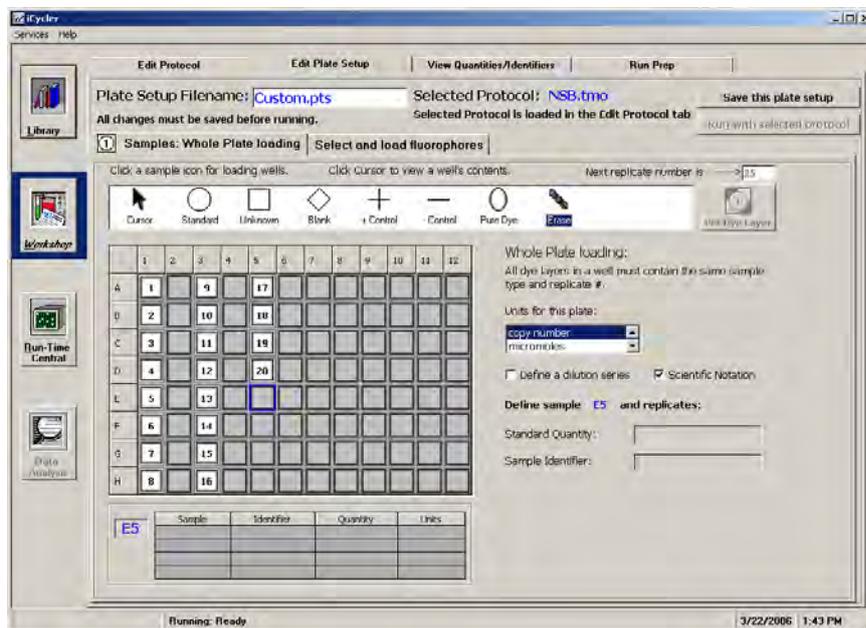
2. В меню *Edit Protocol* запрограммируйте прибор с помощью вспомогательных клавиш.

Программа амплификации «41-90»:

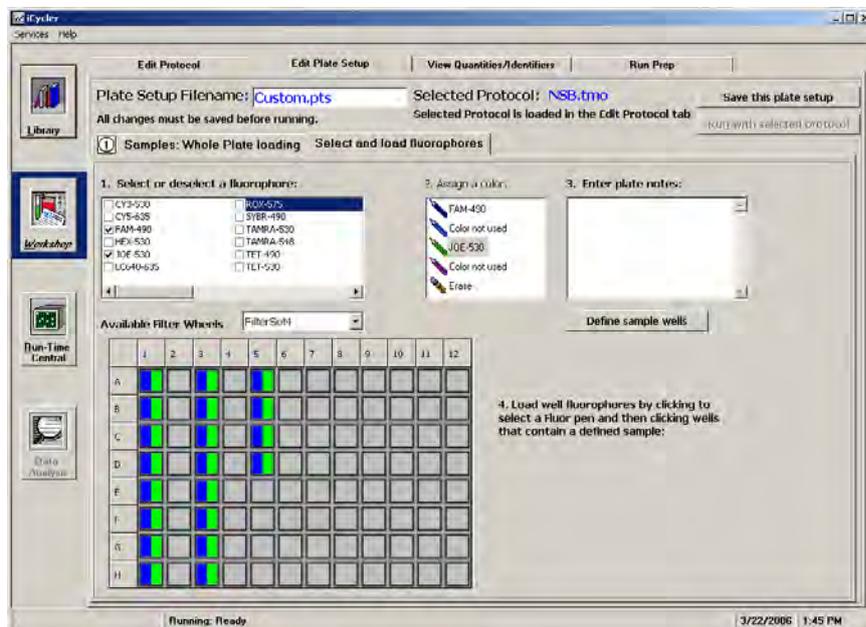
90 циклов: 41 °С – 45 с, детекция флуоресценции на первом цикле первого шага.



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



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



Для прибора «iCycler iQ5» для создания схемы планшета в окне *Selected Plate Setup* модуля *Workshop* нажать кнопку *Create New* или *Edit Plate Setup*. Редактировать схему планшета в режиме *Whole Plate loading*. Для того чтобы

включить второй флуорофор, использовать пиктограмму  над схемой. Задать объем реакции (*Sample Volume*) 20 мкл, тип крышек (*Seal Type*): *Domed Cap*, тип пробирок (*Vessel Type*): *Tubes*. Сохранить заданную схему планшета, нажав кнопку *Save & Exit Plate Editing*. **Необходимо провести калибровку прибора под заданные параметры объема и типа пробирок!**

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

Перед запуском выполнения программы в окне *Run Prep* модуля *Workshop* следует проверить правильность выбранного имени протокола и имени схемы планшета. Задать объем реакционной смеси – 20 мкл.

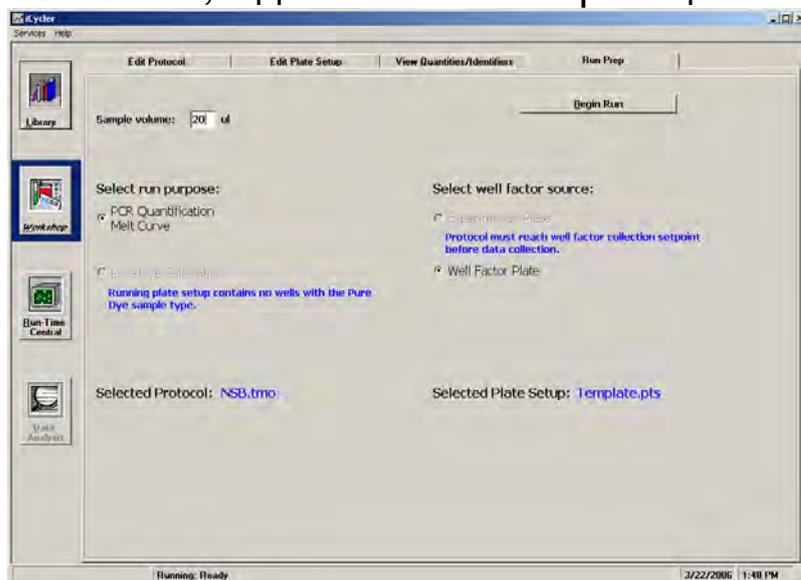
В окне запуска выполнения программы модуля *Run-Time Central* будет автоматически задано использование внешнего планшета для измерения факторов лунок – под строкой *Select well factor source* будет отмечен вариант *Well Factor Plate*.

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

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

После того, как температура реакционного блока достигнет 41 °С, нажать кнопку **Pause**, открыть крышку и поместить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии

с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрывать крышку прибора и нажать кнопку **Continue Running Protocol (Resume Run для модели «iQ5»)** в окне блока *Run-Time Central*, ждать окончания реакции.



УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

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

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

Можно использовать автоматически выбираемый уровень пороговой линии (по умолчанию), если он попадает в указанный диапазон.

Чтобы выделить график образца ПКО (или другого желаемого образца) можно воспользоваться кнопкой *Display Wells*, либо установить курсор на графике этого образца и сделать двойной щелчок.

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

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

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

умолчанию), если он попадает в указанный диапазон.
Примечание - Выбранный уровень порога можно использовать и при учете результатов амплификации РНК ВКО СТ-рес при последующих анализах с помощью данного набора, при условии, что не производилась новая калибровка прибора.

Положительный и отрицательный результаты.

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

Таблица 2.

Оценка результатов анализа

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

Результаты не подлежат учету:

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

Возможные ошибки

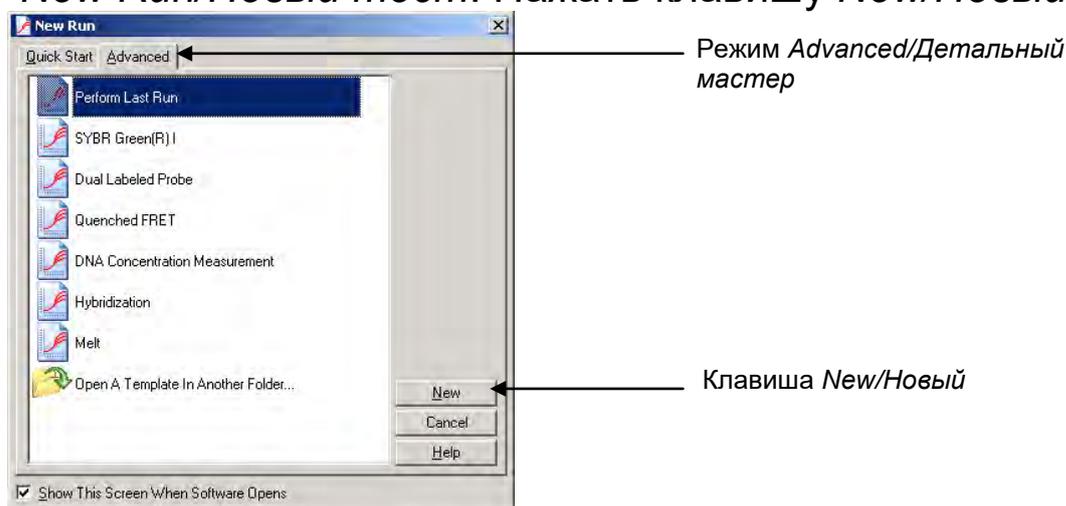
Отсутствие сигнала по каналу ROX как в клинических образцах, так и в отрицательном контроле выделения (ОК), а также, отсутствие сигнала по каналу FAM в положительном контроле амплификации (К+) могут быть вызваны:

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

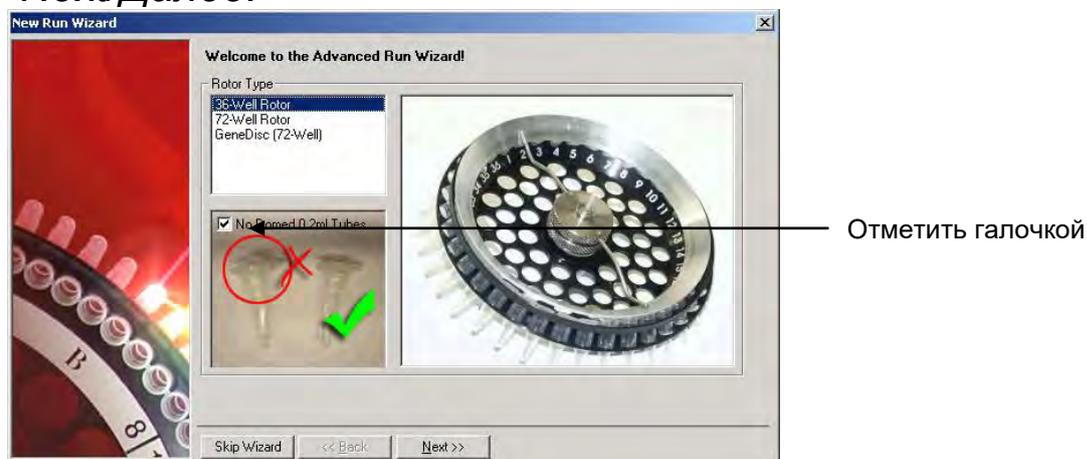
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ. АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ПРИБОРА «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия).

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

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



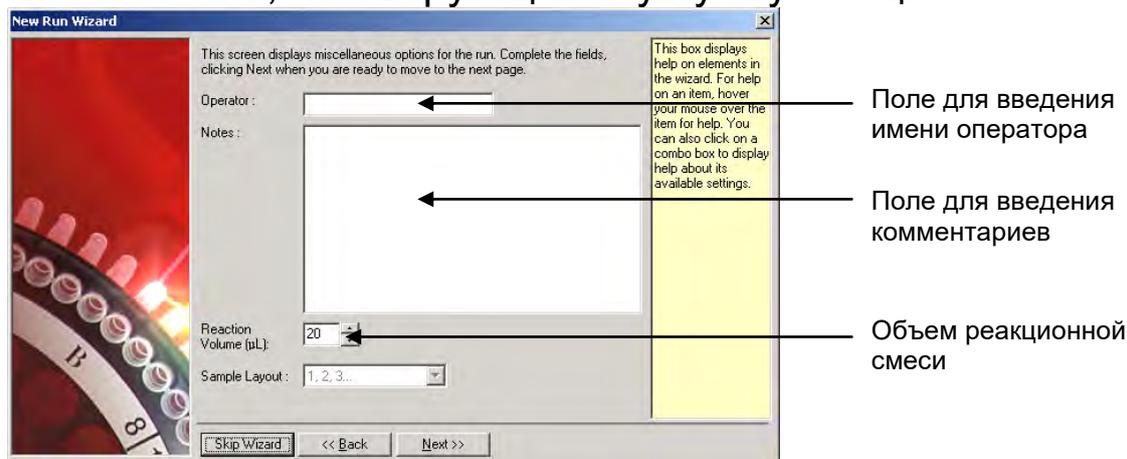
2. В следующем окне пометить бокс удостоверяющий, что вы используете пробирки с плоской крышкой. Нажать клавишу *Next/Далее*.



3. В следующем окне введите имя оператора. Если это необходимо, какие-либо замечания по тесту. А также объем
Форма 1: **REF** TN-B101, **REF** HK14-0161-9-4; Форма 2: **REF** N-B101, **REF** H-0162-9-4 /
VER 19.11.15 / стр. 39 из 45

реакционной смеси, который равен 20 мкл. Нажмите клавишу *Next/Далее*.

- Для прибора «Rotor-Gene» 6000 требуется использовать программу версии 1.7 Build 67 (или аналогичную более позднюю версию). В окне, следующем после окна выбора ротора, необходимо установить объем реакционной смеси *Reaction volume/Объем реакции (μL)* равный **20**. Для «Rotor-Gene» 6000 после этого автоматически будет установлена галочка в боксе *15 μl oil layer volume/15 μL объем масла/воска*, активирующая эту нужную опцию.



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

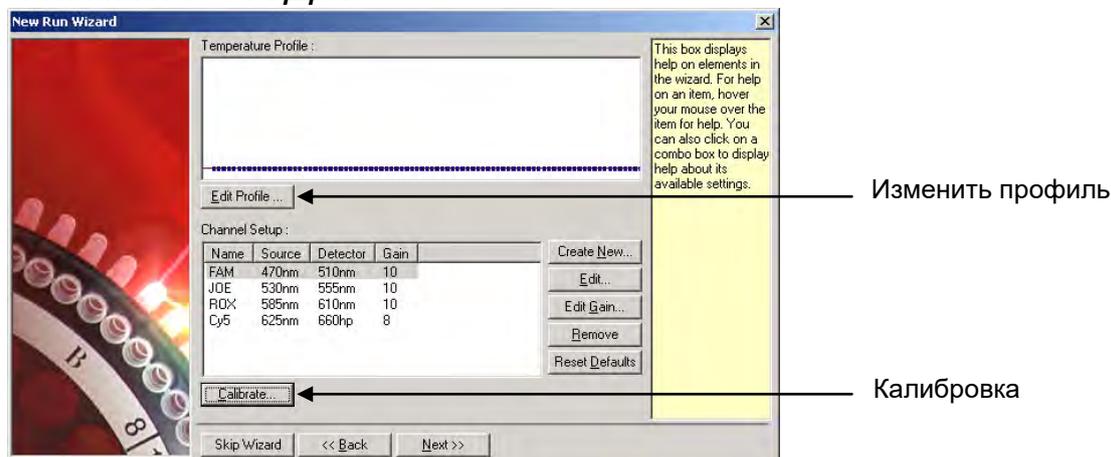
Программа «41-90» для амплификатора «Rotor-Gene» 3000/6000:

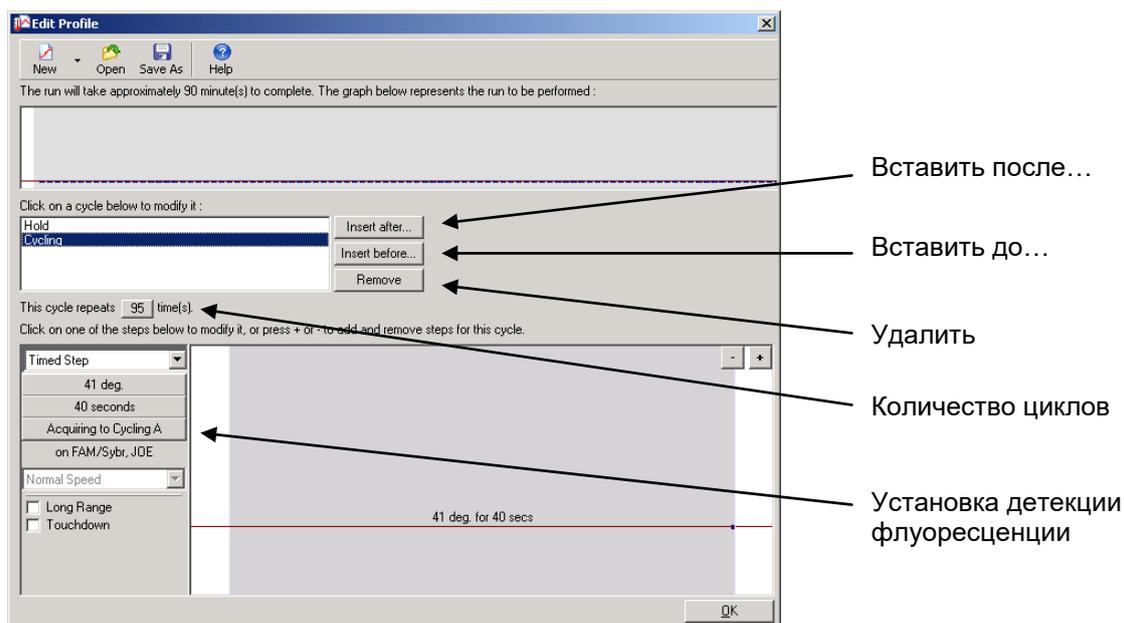
41 °C – 1 мин

95 циклов: 41 °C – 40 с

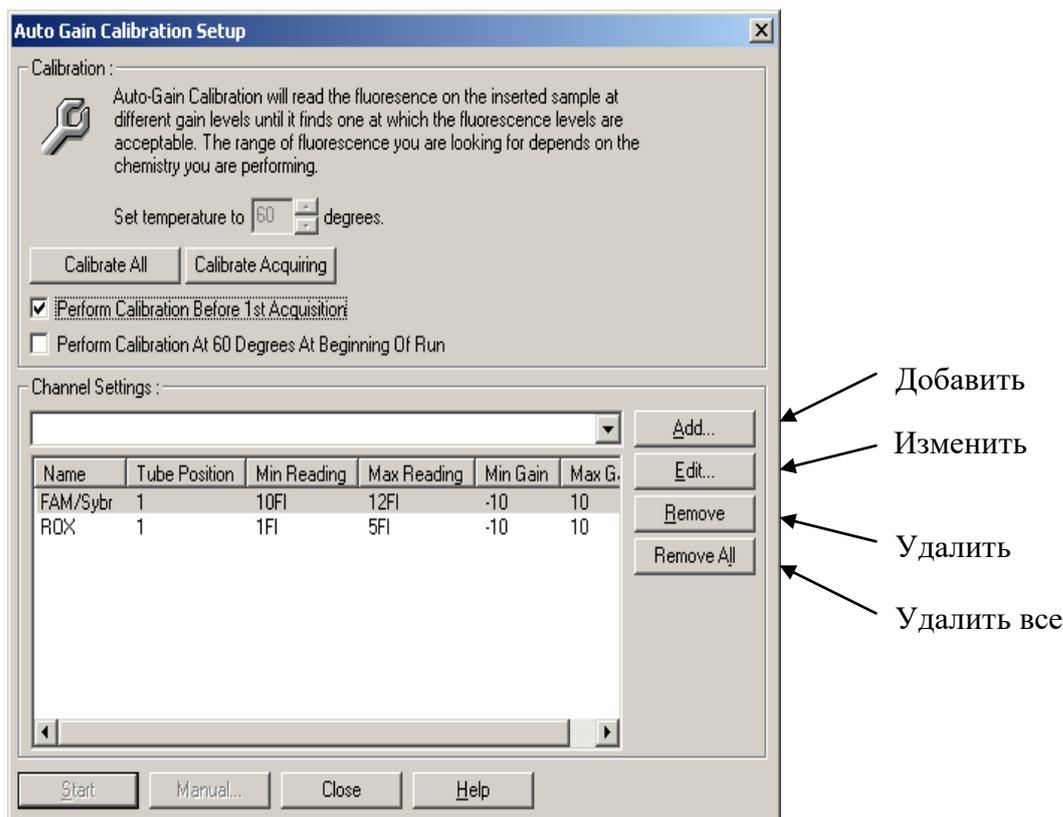
детекция флуоресценции по каналам FAM/Green и ROX/Orange.

- Нажмите *OK/Да*.





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



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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

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

1. Выбрать в главном меню значок меню *Analysis/Анализ*, в выпадающем меню выбрать вкладку *Quantitation/Количественный*. Выполнить эту операцию для данных канала FAM/Green, выбрав в поле *Cycling A*

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

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

Положительный и отрицательный результаты.

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

Таблица 3.

Оценка результатов анализа

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

Результаты не подлежат учету:

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

Возможные ошибки.

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

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.

	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
	Код партии		Максимальное число тестов
	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Производитель		Дата изготовления