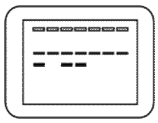
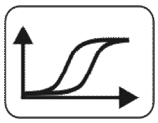
ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ









ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК
микоплазмы гениталиум (Mycoplasma genitalium)
методом полимеразной цепной реакции

ПЛАЗМОГЕН-Мг

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/02550 от 05 февраля 2018 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ ... 3
1 НАЗНАЧЕНИЕ ... 5
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА ... 5
2.1 Состав набора ... 6
2.2 Число анализируемых проб ... 7
2.3 Принцип метода ... 8
2.4 Время проведения анализа. ... 9
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ... 9
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ... 10
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ ... 11
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ ... 13
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА ... 17
7.1 Выделение ДНК из биологического материала ... 17
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S ... 17
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка W. ... 18
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка W, с использованием дозирующего устройства ДТстрим ... 19
7.5 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U ... 20
7.6 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим ... 21
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ... 22
8.1 Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора ... 22
8.2 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов ... 22
8.3 Регистрация результатов амплификации с использованием гель-электрофореза ... 22
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ ... 23
9.1 Учет результатов реакции с помощью ПЦР-детектора или детектирующего амплификатора ... 23
9.2 Учет результатов реакции с помощью гель-электрофореза ... 24
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ ... 25
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ ... 26
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ ... 26
13 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА ... 26
14 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ ... 27
15 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ ... 28
ПРИЛОЖЕНИЕ ... 29

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВВЕДЕНИЕ

Mycoplasma genitalium была впервые выделена в 1980 году. При наличии симптомов инфекция *Mycoplasma genitalium* может протекать в виде уретрита (острого и хронического), дизурии, уретральных выделений, баланопостита. Осложнениями инфекции *Mycoplasma genitalium* у мужчин могут быть сексуально приобретенный реактивный артрит и эпидидимит.

Для женщин показана связь между инфекцией *Mycoplasma genitalium* и уретритом, цервицитом, эндометритом и воспалительными заболеваниями органов малого таза, преждевременными родами, спонтанным абортом и повышенным риском трубного бесплодия. Передача *Mycoplasma genitalium* в основном происходит путем непосредственного контакта слизистых оболочек при половых контактах, в том числе аногенитальных.

Применение набора реагентов для выявления ДНК микоплазмы гениталиум (*Mycoplasma genitalium*) позволяет своевременно выявить возбудителя и назначить лечение, в том числе и с использованием специфических препаратов. Изделие может использоваться для контроля успешности лечения путем повторных исследований. Отрицательный результат исследования позволяет исключить микоплазмоз при проведении дифференциальной диагностики заболеваний.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jensen J.S., Cusini M., Gomberg M, Moi H. Background review for the 2016 European guideline on Mycoplasma genitalium infections. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016 Oct;30(10):1686-1693.
2. Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Jensen JS. The biology of Mycoplasma genitalium. Venereology 2000; 13: 119–127.
3. Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM, Rose DL. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. Lancet 1981; 1: 1288– 1291.
4. Cohen CR, Manhart LE, Bukusi EA et al. Association between Mycoplasma genitalium and acute endometritis. Lancet 2002; 359: 765– 766.
5. Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK et al. Mucopurulent cervicitis and Mycoplasma genitalium. J Infect Dis 2003; 187: 650–657.
6. Cohen CR, Mugo NR, Astete SG et al. Detection of Mycoplasma genitalium in women with laparoscopically diagnosed acute salpingitis. Sex Transm Infect 2005; 81: 463–466.
7. Anagrius C, Lore B, Jensen JS. Mycoplasma genitalium: prevalence, clinical significance, and transmission. Sex Transm Infect 2005; 81: 458–462.
8. Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. Mycoplasma genitalium infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2015; 61: 418–426.
9. Oakeshott P, Hay P, Taylor-Robinson D et al. Prevalence of Mycoplasma genitalium in early pregnancy and relationship between its presence and pregnancy outcome. BJOG 2004; 111: 1464–1467.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. Salado-Rasmussen K, Jensen JS. Mycoplasma genitalium testing pattern and macrolide resistance: a Danish nationwide retrospective survey. Clin Infect Dis 2014; 59: 24–30.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов для выявления ДНК микоплазмы гениталиум (*Mycoplasma genitalium*) методом полимеразной цепной реакции (ПЛАЗМОГЕН-Мг) по ТУ 9398-440-46482062-2008.

1.2 Набор реагентов предназначен для выявления ДНК микоплазмы гениталиум (*Mycoplasma genitalium*) методом ПЦР в биологическом материале человека: соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта, моча, секрет простаты, эякулят.

1.3 Функциональное назначение: Изделие предназначено для диагностики *in vitro* (выявление ДНК *Mycoplasma genitalium* методом ПЦР в биологическом материале человека).

1.4 Показания к проведению исследования: симптомы инфекционного или воспалительного заболевания мочеполового тракта, контроль лечения микоплазмоза.

1.5 Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.

1.6 Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике для диагностики *Mycoplasma genitalium in vitro*.

1.7 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

1.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов ПЛАЗМОГЕН-Мг выпускается в следующих вариантах исполнения:

- ПЦР с детекцией в режиме реального времени;
- ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке;
- ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза.

Варианты исполнения различаются способом детекции амплифицированной ДНК *Mycoplasma genitalium*:

- «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» (маркируется «Real-time») – предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью амплификаторов детектирующих;
- «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» (маркируется «Flash») – предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- «ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза» (маркируется «Eph») – предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

2.1 Состав набора

2.1.1 ПЦР с детекцией в режиме реального времени

REF R1-P103-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость, под воскообразным белым слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R1-P103-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость, под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R1-P103-WA/9, фасовка W			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная жидкость от бесцветного до розового цвета	2 пробирки	по 1,0 мл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Парафин	Воскообразная масса белого цвета	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

REF R1-P103-UA/9, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная жидкость от бесцветного до розового цвета	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

2.1.2 ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке

REF F1-P103-51/1, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость, под воскообразным белым слоем	100 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
ПЦР-буфер (фон)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

2.1.3 ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза

REF E1-P103-50/1, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная жидкость малинового цвета, под воскообразным белым слоем	100 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

2.2 Число анализируемых проб

Набор реагентов предназначен для одноразового применения и рассчитан на 96 определений для исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» и 100 определений для исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» и «ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза», включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

Набор реагентов в фасовках U и W рассчитан на проведение 96 определений при условии постановки не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, положительный и отрицательный контрольные образцы).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов: в режиме реального времени, с флуоресцентной детекцией по конечной точке, методом гель-электрофореза; качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Горячий старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина или использования Taq-полимеразы блокированной антителами. Старт полимеразной цепной реакции происходит только при расплавлении парафина или температурной диссоциации комплекса Taq-полимеразы и антител, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В наборах исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» и «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» в реакционную смесь введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в исполнении «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» или после проведения амплификации в исполнении «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке».

В состав смеси для амплификации включен внутренний контроль (ВК), который предназначен для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации искомой ДНК, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации внутреннего контроля, входит флуоресцентный краситель Hex. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Mycoplasma genitalium	ВК	-	-	-

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку позволяет одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Исследование с использованием набора реагентов ПЛАЗМОГЕН-Мг состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium*, детекция продуктов амплификации.

Для проведения ПЦР используют амплификаторы и амплификаторы детектирующие. Для анализа продуктов ПЦР используют ПЦР-детекторы или метод электрофореза в агарозном геле. При использовании наборов исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» этапы ПЦР-амплификации ДНК и детекции ДНК совмещены.

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку) – от двух часов, в зависимости от используемого набора для выделения ДНК.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность анализа

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК *Mycoplasma genitalium*, ПЦР-детектор («ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке») или детектирующий амплификатор («ПЦР с детекцией в режиме реального времени») должны регистрировать положительный результат наличия специфического продукта (фрагмента генома *Mycoplasma genitalium*). При использовании метода гель-электрофореза («ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза»), должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома *Mycoplasma genitalium* размером 203 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Mycoplasma genitalium*, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должны регистрировать отрицательный результат наличия специфического продукта (фрагмента генома *Mycoplasma genitalium*) и положительный результат внутреннего контроля. При использовании метода гель-электрофореза полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома *Mycoplasma genitalium* размером 203 п.н. отсутствует, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., должна быть отчетливо видна.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis, Streptococcus sp*., *Staphylococcus sp*., а также ДНК человека в концентрации до $1{,}0\times10^8$ копий/мл образца.

3.2 Предел обнаружения:

не более 5 копий ДНК *Mycoplasma genitalium* на амплификационную пробирку.

Предел обнаружения установлен путем анализа серийных разведений лабораторного контрольного образца (ЛКО). Для каждой концентрации было проведено 94 определения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Концентрация ЛКО, копий на амплификационную пробирку	Количество повторов	Количество положительных результатов	% положительных результатов
10	94	94	100
5	94	94	100
2	94	86	91,5
0	94	0	0

Примечание – Предел обнаружения ДНК *Mycoplasma genitalium* в образце зависит от метода пробоподготовки образца и конечного объёма выделенной ДНК (объёма элюции).

Например: Предел обнаружения 5 копий на амплификационную пробирку соответствует следующим значениям концентрации ДНК *Mycoplasma genitalium* при использовании комплектов для выделения нуклеиновых кислот производства ООО «НПО ДНК-Технология»:

Образец	**Комплекты для выделения нуклеиновых кислот**			
	ПРОБА-НК	**ПРОБА-ГС**	**ПРОБА-МЧ-РАПИД (при элюции в 300 мкл)**	**ПРОБА-РАПИД**
- соскоб эпителиальных клеток в 500 мкл транспортной среды; - эякулят в 500 мкл транспортной среды; - секрет простаты в 500 мкл транспортной среды; - моча (при выделении из 1,0 мл образца)	50 копий/образец	100 копий/образец	300 копий/образец	500 копий/образец

3.3 Диагностические характеристики:

Количество образцов (n) – 398;

Диагностическая чувствительность составляет (95% ДИ): 98,0% (92,0-98,0%);

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ): 100% (99,1-100,0%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Общие требования безопасности к наборам реагентов для *in vitro* диагностики в соответствии с ГОСТ ISO 14971-2011.

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, 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», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в ламинарных шкафах с включенным ламинарным потоком. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов следует проводить в ПЦР-боксах.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации за исключением этапа проведения детекции методом гель-электрофореза, который проводят в зоне 4 (МУ 1.3.2569-09).

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

При использовании набора реагентов в исполнении «ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза» для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК, ПЦР и детекции следует проводить в раздельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.

Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

При использовании набора в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов ПЛАЗМОГЕН-Мг требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Real-time	Flash	Eph
ПЦР-бокс	да	да	да
амплификатор детектирующий	да	нет	нет
детектор полимеразной цепной реакции флуоресцентный	нет	да	нет
термостат программируемый для ПЦР-анализа	нет	да	да
термостат твердотельный программируемый малогабаритный	да[1]	нет	нет
устройство для электрофореза нуклеиновых кислот в агарозных и акриламидных гелях	нет	нет	да
трансиллюминатор ультрафиолетовый (флуоскоп)	нет	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да
холодильник бытовой с морозильной камерой	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок	да	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 0,5-10 мкл, 2,0-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками	да	да	да
пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл с крышками	да[2]	нет	нет
колба мерная, вместимостью 1000 мл	нет	нет	да
вода дистиллированная	да	да	да
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да
реагенты для детекции нуклеиновых кислот в агарозных гелях	нет	нет	да
маркер длин амплифицированных фрагментов (pUC19 ДНК/MspI)	нет	нет	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да
дезинфицирующее средство	да	да	да
дозирующее устройство ДТстрим	да[3]	нет	нет
герметизирующее устройство ДТпак			
центрифуга для микропланшет ПЦР			
полимерная термопленка для запечатывания микропланшет ПЦР			
микропланшет ПЦР (96 лунок)	да[4]	нет	нет
микропланшет ПЦР (384 лунки)	да[5]	нет	нет

[1] для фасовки W
[2] для фасовок U, W
[3] для фасовок U, W с использованием автоматизированного дозирования
[4] для фасовки W с использованием автоматизированного дозирования
[5] для фасовки U с использованием автоматизированного дозирования

Приборное обеспечение

Для проведения ПЦР используют амплификаторы и амплификаторы детектирующие. Для анализа продуктов ПЦР используют ПЦР-детекторы или метод электрофореза в агарозном геле. При использовании наборов исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» этапы ПЦР-амплификации ДНК и детекции ДНК совмещены.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- ПЦР с детекцией в режиме реального времени: амплификаторы детектирующие ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 или ДТ-322 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.3.4.0[1] или амплификаторы iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories), Rotor-Gene Q (QiaGen). Возможность использования других амплификаторов необходимо уточнить у представителя компании «ДНК-Технология».
- ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке: термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырехканальный «Терцик» или аналогичный, детектор флуоресцентный «Джин» или «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология»).
- ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза: термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырехканальный «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») или аналогичный.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве биологического материала используют соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта, мочу, секрет простаты, эякулят.

Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию принимает лечащий врач на основании совокупности жалоб пациента и клинической картины.

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса.

Для получения корректных результатов имеет значение качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

6.1 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см.раздел 2.3, раздел 9.1.4, 9.2.3).

К ингибиторам ПЦР относятся следующие вещества: присутствие в образце слизи, примесей крови; лубриканты, тальк, местные лекарственные препараты.

Для снижения количества ингибиторов ПЦР необходимо соблюдать правила взятия биологического материала. При подозрении на наличие в образце большого количества ингибиторов ПЦР рекомендуется выбирать методы выделения ДНК, позволяющие максимально удалить ингибиторы ПЦР из образца, не рекомендуется использовать экспресс-методы выделения ДНК.

[1] - производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: htt://www.dna-technology.ru/po/

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.2 Особенности взятия урогенитальных соскобов

Женщины накануне обследования не должны проводить туалет половых органов и спринцевание. Для получения объективного результата необходимо, чтобы исследуемый материал содержал возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи и примеси крови. Неправильное взятие биоматериала может привести к недостоверному результату и, вследствие этого, необходимости повторного взятия биоматериала.

6.2.1 Особенности взятия материала из влагалища

Материал должен быть взят до проведения мануального исследования. Зеркало перед манипуляцией можно смочить горячей водой, применение антисептиков для обработки зеркала противопоказано. Соскоб берут с заднебокового свода влагалища. У девочек взятие материала производят со слизистой оболочки преддверия влагалища, а в отдельных случаях – из заднего свода влагалища через гименальные кольца.

6.2.2 Особенности взятия материала из уретры

Перед взятием биоматериала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5–2 часов.

Непосредственно перед взятием биоматериала необходимо обработать наружное отверстие уретры тампоном, который можно смочить стерильным физиологическим раствором.

При наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15–20 минут после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия биоматериала. В уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0–1,5 см, у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры.

6.2.3 Особенности взятия материала из цервикального канала:

Перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором. Зонд вводят в цервикальный канал на глубину 0,5–1,5 см. При извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание стенок влагалища.

6.3 Соскобное отделяемое урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры)

Ограничение метода – местное применение лекарственных препаратов, УЗИ вагинальным датчиком менее чем за 24 часа до исследования.

Взятие материала осуществляют с помощью специальных стерильных одноразовых инструментов – урогенитальных зондов, цитощеток или тампонов, в зависимости от источника клинического материала, согласно установленной процедуре.

Взятие соскобов проводится:

- в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл, в которые предварительно внесено 300-500 мкл физиологического раствора стерильного;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- в пробирки с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований;
- в пробирки с реактивом «ПРОБА-РАПИД» (производитель ООО «НПО ДНК-Технология»).

ВНИМАНИЕ! «ПРОБА-РАПИД» не рекомендуется для выделения ДНК из соскобов из урогенитального тракта у мужчин.

Порядок взятия:

1. Откройте крышку пробирки.
2. Перенесите зонд с биоматериалом в пробирку с физиологическим раствором, транспортной средой или реактивом «ПРОБА-РАПИД», и тщательно прополощите его, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлеките зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, отожмите избыток жидкости, удалите зонд и выбросьте. При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.
3. Плотно закройте крышку пробирки, промаркируйте пробирку.

ВНИМАНИЕ! Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч.

Предобработку, пробоподготовку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту/набору реагентов для выделения ДНК из биологического материала.

4. При взятии соскобов в пробирки с физиологическим раствором или транспортной средой перед выделением ДНК комплектами «ПРОБА-ГС» или «ПРОБА-НК» выполните предобработку:

4.1 Пробирку, содержащую анализируемый материал, центрифугируйте при 13 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

Примечание – Используйте центрифугу для пробирок объёмом 1,5 мл с RCF не ниже 13 000 × g, например, центрифугу HERAEUS pico17 (17 000 × g или 13 000 об/мин).

4.2 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция) при использовании для выделения комплекта реагентов ПРОБА-ГС или 100 мкл (осадок + жидкая фракция) при использовании для выделения комплекта реагентов ПРОБА-НК. Пробирки плотно закрыть крышками.

Полученный материал готов для выделения ДНК.

При взятии соскобов в пробирки с реактивом «ПРОБА-РАПИД» дополнительной предобработки не требуется, материал готов для выделения ДНК.

6.4 Первая порция утренней мочи

Первую порцию утренней мочи в качестве биологического материала используют при остром воспалительном процессе нижних отделов мочеполового тракта в связи с выраженной болезненностью взятия соскоба эпителиальных клеток.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 10–15 мл. Возможно исследование первой порции мочи, полученной через два и более часов после предшествующего мочеиспускания.

Отбор мочи проводят в специальную сухую стерильную ёмкость объёмом до 60 мл, снабжённую герметично завинчивающейся крышкой.

После сбора мочи контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.5 Секрет простаты (предстательной железы)

Перед взятием секрета простаты рекомендуется половое воздержание в течение трех суток до исследования.

Перед взятием секрета простаты головку полового члена обрабатывают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

Секрет простаты собирают после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Массаж проводит врач, посредством энергичного надавливающего движения от основания к верхушке железы.

После окончания массажа выделившийся простатический секрет в виде свободно стекающей капли (0,15–1,0 мл) собирают в одноразовую сухую стерильную пробирку объёмом 2 мл или контейнер объёмом до 60 мл.

Ёмкость с секретом простаты герметично закрывают крышкой и маркируют.

ВНИМАНИЕ! При подозрении на острый простатит выполнять массаж простаты категорически запрещено!!!

6.6 Эякулят

Перед сбором эякулята (семенной жидкости) рекомендуется половое воздержание в течение трех суток до исследования.

Перед сбором эякулята пациент мочится в туалете, полностью опорожняя мочевой пузырь.

После мочеиспускания пациент должен тщательно вымыть руки с мылом и провести туалет наружных половых органов с мылом и водой. Головку полового члена и крайнюю плоть необходимо высушить стерильной салфеткой.

Эякулят получают путем мастурбации и собирают в стерильный контейнер объёмом до 60 мл.

Ёмкость с эякулятом герметично закрывают крышкой и маркируют.

6.7 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение одного месяца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

7.1.1 Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуются комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-МЧ-РАПИД. Не рекомендуется использовать комплект реагентов ПРОБА-РАПИД при выделении ДНК из соскобов из урогенитального тракта мужчин.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК из биологического материала одновременно необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор, в объёме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

7.2.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином: для исследуемых образцов, для положительного контрольного образца (К+) и отрицательного контрольного образца (К-). При использовании набора реагентов в исполнении «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» промаркируйте дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

Пример: Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого необходимо:

- «ПЦР с детекцией в режиме реального времени», «ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза»: промаркировать 4 пробирки для исследуемых образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.
- «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке»: промаркировать 4 пробирки для исследуемых образцов, одну пробирку для «К-», одну пробирку для «К+», две пробирки «ФОН». Общее количество пробирок – 8.

7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Добавьте во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавьте по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).

7.2.4 Добавьте в каждую пробирку (при необходимости) по одной капле минерального масла (около 20 мкл). Закройте плотно пробирки.

7.2.5 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом (К+) и отрицательным контрольным образцом (К-) в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»).

7.2.7 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1),

7.2.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.9 Внесите в пробирки, промаркированные «ФОН», 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1).

Примечание - Готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии набора реагентов. Нормировочные пробирки хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение одного месяца в темном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру от 18 °С до 25 °С, для этого, за один час до проведения детекции, их необходимо достать из холодильника.

7.2.10 Центрифугируйте все пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.11 Установите все пробирки в термостат программируемый или в блок амплификатора и проведите ПЦР в режиме, приведенном для амплификаторов с активным регулированием, с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл. Программы амплификации для фасовки S приведены в таблицах А.1-А.6 (Приложение А).

Примечание - Продукты амплификации можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение одного месяца или при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение 12 месяцев.

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка W.

7.3.1 Промаркируйте необходимое количество чистых амплификационных пробирок объёмом 0,2 мл: для исследуемых образцов, для положительного контрольного образца (К+) и отрицательного контрольного образца (К-).

Пример: Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого необходимо промаркировать 4 пробирки для исследуемых образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.

7.3.2 Встряхните пробирку со смесью для амплификации в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.3 Внесите в каждую промаркированную пробирку по 20 мкл смеси для амплификации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.3.4 Добавьте в каждую промаркированную пробирку по одной капле (около 20 мкл) предварительно расплавленного парафина. Закройте пробирки крышками.

ВНИМАНИЕ! Парафин должен быть предварительно расплавлен на твердотельном термостате при температуре 80 °С в течение 10 минут.

7.3.5 Центрифугируйте пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.6 Поместите пробирки в твердотельный термостат и инкубируйте при температуре 80 °С в течение 5 минут.

7.3.7 Перенесите пробирки в штатив "рабочее место", не наклоняя и не переворачивая и инкубируйте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С до полного застывания парафина (обычно 5 минут).

7.3.8 Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.9 Внесите во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.

7.3.10 Добавьте в каждую пробирку (при необходимости) по одной капле минерального масла (около 20 мкл). Закройте плотно пробирки.

7.3.11 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом (К+) и отрицательным контрольным образцом (К-) в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.3.12 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»).

7.3.13 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1),

7.3.14 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.15 Центрифугируйте все пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.16 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл. Программы амплификации для фасовки W приведены в таблицах А.1-А.4 (Приложение А).

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка W, с использованием дозирующего устройства ДТстрим

7.4.1 Встряхните пробирку со смесью для амплификации в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.4.2 Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.4.3 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом (К+) и отрицательным контрольным образцом (К-) в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.4.4 Установите пробирки со смесью для амплификации, раствором Taq-полимеразы, парафином, минеральным маслом, с препаратами ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом, а так же микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.4.5 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.4.6 Проведите процедуру запечатывания микропланшет термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.4.7 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.

7.4.8 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл. Программы амплификации для фасовки W приведены в таблицах А.1-А.4 (Приложение А).

7.5 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U

7.5.1 Промаркируйте необходимое количество чистых амплификационных пробирок объёмом 0,2 мл: для исследуемых образцов, для положительного контрольного образца (К+) и отрицательного контрольного образца (К-).

Пример: Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого необходимо промаркировать 4 пробирки для исследуемых образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.

7.5.2 Встряхните пробирку со смесью для амплификации в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.5.3 Внесите в каждую промаркированную пробирку по 6,0 мкл смеси для амплификации.

7.5.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Полимеразу ТехноТаq МАХ доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.5.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq МАХ. Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 6,0 х (N+1) мкл ПЦР-буфера;
- 0,3 х (N+1) мкл полимеразы ТехноТаq МАХ,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К-», «К+».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Пример: Необходимо проанализировать 4 образца, «К-», «К+».
Промаркированных пробирок – 6.
Необходимо приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ для 7 (6+1) пробирок, т.е. 42 мкл ПЦР-буфера + 2,1 мкл полимеразы ТехноТаq МАХ.

7.5.6 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.5.7 Добавьте в пробирки со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ. Закройте плотно пробирки.

Примечание – После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ в пробирки со смесью для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп.7.5.8 - 7.5.13

7.5.8 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом (К+) и отрицательным контрольным образцом (К-) в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.5.9 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки 6,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»).

7.5.10 Внесите в пробирку, промаркированную «К-» 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1).

7.5.11 Внесите в пробирку, промаркированную «К+» 6,0 мкл положительного контрольного образца.

7.5.12 Центрифугируйте все пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.5.13 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл. Программы амплификации для фасовки U приведены в таблицах Б.1-Б.4 (Приложение Б).

7.6 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим

7.6.1 Встряхните пробирку со смесью для амплификации в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.6.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТаq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Полимеразу ТехноТаq МАХ доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.6.3 Следуя указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, в отдельной пробирке приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТаq МАХ.

7.6.4 Встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.6.5 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом (К+) и отрицательным контрольным образцом (К-) в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.6.6 Установите пробирки со смесью для амплификации, со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ, с препаратами ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом, а так же микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.6.7 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.6.8 Проведите процедуру запечатывания микропланшет термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.6.9 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.

7.6.10 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл. Программы амплификации для фасовки U приведены в таблицах Б.1-Б.4 (Приложение Б).

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора

После прохождения реакции амплификации пробирки поместите в ПЦР-детектор, оформите протокол и проведите регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

8.2 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

8.3 Регистрация результатов амплификации с использованием гель-электрофореза

8.3.1 По окончании реакции амплификации результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для детекции продуктов ПЦР методом гель-электрофореза.

8.3.2 Откройте крышки пробирок с продуктами амплификации и проколите в парафине отверстие диаметром примерно 2-3 мм с помощью стальной проволоки. После

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в ёмкости с водопроводной водой.

8.3.3 Внесите осторожно 7,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буферный раствор.

8.3.4 Установите крышку камеры для электрофореза и подключите источник постоянного тока. Электрофорез проводят при напряжении 20 Вольт/см в течение 10 мин (при ширине камеры 10 см, напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

8.3.5 Отключите источник постоянного тока после окончания электрофореза, снимите крышку с камеры.

8.3.6 Выньте пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снимите гель с пластины, подцепив его с края, и поместите на экран трансиллюминатора.

8.3.7 Наденьте защитную маску или установите защитный экран, включите трансиллюминатор и проанализируйте полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учет результатов реакции с помощью ПЦР-детектора или детектирующего амплификатора

9.1.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

9.1.2 В биологических образцах, содержащих ДНК *Mycoplasma genitalium* (специфический продукт):

- программа ПЦР-детектора фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается;
- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.

9.1.3 В биологических образцах, не содержащих ДНК *Mycoplasma genitalium*:

- программа ПЦР-детектора при положительном результате амплификации внутреннего контрольного образца фиксирует отрицательный результат;
- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции внутреннего контрольного образца и отсутствие экспоненциального роста кривой для специфического продукта.

9.1.4 Результат оценивается как недостоверный в случае:

- отрицательного результата на наличие ДНК *Mycoplasma genitalium* и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца (ПЦР-детектор).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта и для внутреннего контрольного образца (детектирующий амплификатор). Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.1.5 Программа ПЦР-детектора фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфического продукта попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.1.6 При получении положительного результата (ПЦР-детектор) или экспоненциального роста флуоресценции (детектирующий амплификатор) для специфического продукта в отрицательном контрольном образце (К-) результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

9.2 Учет результатов реакции с помощью гель-электрофореза

9.2.1 В положительных образцах должны быть видны полосы оранжево-красного цвета на уровне полосы положительного контрольного образца, соответствующие фрагменту генома *Mycoplasma genitalium* размером 203 п.н. Наличие или отсутствие полосы, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., в этом случае в учет не принимают.

9.2.2 В отрицательных образцах, в том числе в отрицательном контрольном образце, светящиеся полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту генома *Mycoplasma genitalium* размером 203 п.н. должны отсутствовать, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., должна быть отчетливо видна.

9.2.3 В случае отсутствия в исследуемом образце полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту генома *Mycoplasma genitalium* размером 203 п.н. и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н. результат считают недостоверным. Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.2.4 В случае наличия полосы, соответствующей фрагменту генома *Mycoplasma genitalium* размером 203 п.н., в отрицательном контрольном образце (К-) результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.

10.1.2 Допускается транспортирование набора реагентов в фасовке U при температуре от 2 °С до 8 °С не более 5 суток.

10.1.3 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

10.2.1 Компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТаq MAX, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

10.2.2 Полимеразу ТехноТаq MAX следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

10.2.3 Смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора.

10.2.4 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, а также с истекшим сроком годности, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- компоненты набора следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора;
- смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора;
- полимеразу ТехноТаq MAX следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

11.2 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе, в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

11.3 Упаковка набора реагентов (коробки, грипперы) после использования по назначению, относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

IVD	Только для in vitro диагностики		Дата производства
	Температурный диапазон		Содержит инструкцию по применению
	Количество определений	REF	Каталожный номер
	Годен до		Адрес производителя
LOT	Серия набора		Не допускается воздействие солнечного света

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

14 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

15 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001:2015 в области разработка, производство и продажа IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485:2016 в области разработка, производство и продажа IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «Научно-Производственное Объединение ДНК-Технология», ООО «НПО ДНК-Технология» (Общество с ограниченной ответственностью), Россия.

адрес: 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

Место производства:

1) ООО «НПО ДНК-Технология»: Россия, 142281, Московская обл. г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.
2) ООО «ДНК-Технология ТС»: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

Рекламации по вопросам качества набора реагентов ПЛАЗМОГЕН-Мг, следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6., тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (звонок по России бесплатный),

+7(495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/customer_support/

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приложение А

ПЦР с детекцией в режиме реального времени, фасовки S, W

Таблица А.1 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТ-96», «ДТ-322»

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	…	…	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

Таблица А.2 – Программа амплификации для прибора Rotor-Gene Q

№ /Cycling	Температура, °С /Temperature	Время, с /Hold Time, s	Количество циклов /Cycle Repeats
Cycling	80 deg	60	1 time
	94 deg	90	
Cycling 2	94 deg	30	5 times
	57 deg √	15	
Cycling 3	94 deg	10	45 times
	57 deg √	15	
√ - режим оптических измерений, установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам Green (Fam) и Yellow (Hex) при 57 °С.			

Таблица А.3 – Программа амплификации для амплификатора iCycler iQ

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °С	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.					
1	1				
		1	1 min	80,0	
		2	1 min 30 sec	94,0	
2	5				
		1	30 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	
3	2				
		1	30 sec	80,0	Real Time
Программа амплификации					
4	45				
		1	10 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	Real Time
5		…	…	10,0	storage

Таблица А.4 – Программа амплификации для амплификатора iCycler iQ5

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °С	PCR/Melt Data Acquisition
1	1				
		1	1 min	80,0	
		2	1 min 30 sec	94,0	
2	5				
		1	30 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	
3	45				
		1	10 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	Real Time
4		…	…	10,0	storage

ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке, фасовка S

Таблица А.5 – Программа амплификации для амплификаторов с активным регулированием (например, Терцик). Время в скобках указано для амплификаторов без активного регулирования

№ п.п.	Температура, °С	Время		Количество циклов
		мин	с	
1	94,0	1	00	1
2	94,0 64,0 67,0	0 0 0	05 (50) 05 (50) 05 (50)	5
3	94,0 64,0 67,0	0 0 0	01 (50) 05 (50) 05 (50)	40
4	10,0	…	…	Хранение

ПЦР с детекцией методом гель-электрофореза, фасовка S

Таблица А.6 – Программа амплификации для амплификаторов с активным регулированием (например, Терцик). Время в скобках указано для амплификаторов без активного регулирования

№ п.п.	Температура, °С	Время		Количество циклов
		мин	с	
1	94,0	1	30	1
2	94,0 64,0 72,0	0 0 0	20 (50) 05 (50) 05 (50)	5
3	94,0 64,0 72,0	0 0 0	05 (50) 05 (50) 05 (50)	40
4	10,0	…	…	Хранение

При использовании других амплификаторов обратитесь к представителю производителя для уточнения программы амплификации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приложение Б

ПЦР с детекцией в режиме реального времени, фасовка U

Таблица Б.1 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт», «ДТ-96», «ДТ-322»

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	10	…	…	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

Таблица Б.2 – Программа амплификации для прибора Rotor-Gene Q

№ /Cycling	Температура, °С /Temperature	Время, с /Hold Time, s	Количество циклов /Cycle Repeats
Cycling	80 deg	60	1 time
	94 deg	300	
Cycling 2	94 deg	30	5 times
	57 deg √	15	
Cycling 3	94 deg	10	45 times
	57 deg √	15	
√ - режим оптических измерений, установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам Green (Fam) и Yellow (Hex) при 57 °С.			

Таблица Б.3 – Программа амплификации для амплификатора iCycler iQ

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °С	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.					
1	1				
		1	1 min	80,0	
		2	5 min	94,0	
2	5				
		1	30 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	
3	2				
		1	30 sec	80,0	Real Time
Программа амплификации					
4	45				
		1	10 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	Real Time
5		…	…	10,0	storage

Таблица Б.4 – Программа амплификации для амплификатора iCycler iQ5

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °С	PCR/Melt Data Acquisition
1	1				
		1	1 min	80,0	
		2	5 min	94,0	
2	5				
		1	30 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	
3	45				
		1	10 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	Real Time
4		…	…	10,0	storage

При использовании других амплификаторов обратитесь к представителю производителя для уточнения программы амплификации.