«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«26» 05 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для дифференциального выявления ДНК Mycoplasma hominis и ДНК Mycoplasma genitalium
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
«РеалБест ДНК Mycoplasma hominis/Mycoplasma genitalium»
(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК Mycoplasma hominis и ДНК Mycoplasma genitalium методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК Mycoplasma hominis/Mycoplasma genitalium» предназначен для дифференциального выявления ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинического материала проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100».

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридизационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции,

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

который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'–3'-нуклеазной активности Taq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

– положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 1 пробирка, 1 мл;

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок.

Принадлежности:

– оптическая плёнка – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Mycoplasma hominis* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Mycoplasma hominis* (СОП 05-2-313), с содержанием ДНК *Mycoplasma hominis* 100 копий в пробе – 100 %.

Чувствительность выявления ДНК *Mycoplasma genitalium* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Mycoplasma genitalium* (СОП 05-2-312), с содержанием ДНК *Mycoplasma genitalium* 100 копий в пробе – 100 %.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Mycoplasma hominis* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Mycoplasma genitalium* (СОП 05-2-312), с содержанием ДНК *Mycoplasma genitalium* 100 копий в пробе – 100 %.

Специфичность выявления ДНК *Mycoplasma genitalium* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Mycoplasma hominis* (СОП 05-2-313), с содержанием ДНК *Mycoplasma hominis* 100 копий в пробе – 100 %.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК Mycoplasma hominis: клинические испытания, проведенные на 75 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 96,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК Mycoplasma genitalium: клиниче-

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

ские испытания, проведенные на 48 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 94,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК Mycoplasma hominis: клинические испытания, проведенные на 112 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК Mycoplasma genitalium: клинические испытания, проведенные на 139 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (*такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»*).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указа-

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

ния по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой («ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (например, фирма «Eppendorf», Германия);

– встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, фирма «FinnTip», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);

– нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Материалом для определения ДНК Mycoplasma hominis и ДНК Mycoplasma genitalium служат соскобы слизистых оболочек урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры).

Подготовку образцов соскобов проводить в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «Реал-

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

Бест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК возбудителей инфекции и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 ºС – 2 минуты;

2 стадия: 95 ºС – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 ºС – 10 секунд, 60 ºС – 20 секунд).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК возбудите-

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

лей инфекции:

«FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«HEX» – для регистрации сигнала ДНК *Mycoplasma hominis*;

«ROX» – для регистрации сигнала ДНК *Mycoplasma genitalium*.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла Ct ВКО

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma hominis* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла $\mathbf{C_t}$ ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла $\mathbf{C_t}$ ПКО;

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять $\mathbf{C_t}$ ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «HEX» и каналу «ROX».

Если для ОКО значение Ct по каналу «HEX» и/или «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4.).

8.1.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять $\mathbf{C_t}$ ВКО.

8.2. Учёт результатов.

8.2.1. Вычислить $(Ct\ ВКО)_{ср}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$. После отбраковки пересчитать $(Ct\ ВКО)_{ср}$ для оставшихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» и «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО превышает значение $(Ct\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный.

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

Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma hominis*, если для этого образца значение $\mathbf{C_t}$ по каналу «HEX» меньше или равно 40.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma genitalium*, если для этого образца значение $\mathbf{C_t}$ по каналу «ROX» меньше или равно 40.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

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

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК Mycoplasma hominis/ Mycoplasma genitalium» (комплект 1), следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«26» ____05____ 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для дифференциального выявления ДНК Mycoplasma hominis и ДНК Mycoplasma genitalium
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
«РеалБест ДНК Mycoplasma hominis/Mycoplasma genitalium»
(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК Mycoplasma hominis и ДНК Mycoplasma genitalium методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК Mycoplasma hominis/Mycoplasma genitalium» предназначен для дифференциального выявления ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинического материала проводится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100».

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия), так и планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой. В основе реги-

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

страции процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридизационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'−3'-нуклеазной активности Taq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

– положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 1 пробирка, 1 мл;

– реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок, каждая на 10 определений;

– раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона по 2 мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Mycoplasma hominis* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Mycoplasma hominis* (СОП 05-2-313), с содержанием ДНК *Mycoplasma hominis* 100 копий в пробе – 100 %.

Чувствительность выявления ДНК *Mycoplasma genitalium* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Mycoplasma genitalium* (СОП 05-2-312), с содержанием ДНК *Mycoplasma genitalium* 100 копий в пробе – 100 %.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Mycoplasma hominis* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Mycoplasma genitalium* (СОП 05-2-312), с содержанием ДНК *Mycoplasma genitalium* 100 копий в пробе – 100 %.

Специфичность выявления ДНК *Mycoplasma genitalium* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Mycoplasma hominis* (СОП 05-2-313), с содержанием ДНК *Mycoplasma hominis* 100 копий в пробе – 100 %.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК Mycoplasma hominis: клиниче-

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

ские испытания, проведенные на 75 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 96,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК Mycoplasma genitalium: клинические испытания, проведенные на 48 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 94,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК Mycoplasma hominis: клинические испытания, проведенные на 112 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК Mycoplasma genitalium: клинические испытания, проведенные на 139 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп

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

в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»)*.

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия) или планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (например, фирма «Eppendorf», Германия);

– встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «FinnTip», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);

– пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма «Axygen», США, кат. № PCR-02-C или другие, подходящие к используемому амплификатору).

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

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Материалом для определения ДНК Mycoplasma hominis и ДНК Mycoplasma genitalium служат соскобы слизистых оболочек урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры).

Подготовку образцов соскобов проводить в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку, отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с РС и выдержать их при температуре (18-25) °С в течение 30 минут.

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 определений.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

6.2.2. В пробирку с РС добавить 300 мкл РВ, аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при температуре (18-25) °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

РВ после вскрытия флакона хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

Восстановленную РС хранить при температуре (2-8) °С не более 7 суток.

6.2.3. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью

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

0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая контрольные образцы).

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Во все пробирки дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по 25 мкл РС.

7.3. В каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром. Плотно закрыть пробирки крышками.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК возбудителей инфекции и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

– для приборов «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»:

1 стадия: 50 ºС – 2 минуты;

2 стадия: 95 ºС – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 ºС – 10 секунд, 60 ºС – 40 секунд);

– для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 50 ºС – 2 минуты;

2 стадия: 95 ºС – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 ºС – 10 секунд, 60 ºС – 20 секунд);

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК возбудителей инфекции:

«FAM» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«HEX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96»), «JOE» (для прибора «Rotor-Gene 3000»), «Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК *Mycoplasma hominis;*

«ROX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК *Mycoplasma genitalium.*

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

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

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять значение порогового цикла Ct ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma hominis* (канал «HEX»/«JOE»/«Yellow») и определять значение порогового цикла $\mathbf{C_t}$ ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла $\mathbf{C_t}$ ПКО;

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять $\mathbf{C_t}$ ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» и по каналу «ROX»/«Orange».

Если для ОКО значение Ct по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» и/или по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см.п. 8.2.4).

8.1.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять Ct ВКО.

8.2. Учёт результатов.

8.2.1 Вычислить $(Ct\ ВКО)_{ср}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$. После отбраковки пересчитать $(Ct\ ВКО)_{ср}$ для оставшихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение Ct по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» и/или «ROX»/«Orange» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО превышает значение $(Ct\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma hominis,* если для этого образца значение $\mathbf{C_t}$ по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» меньше или равно 40.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma genitalium,* если для этого образца значение $\mathbf{C_t}$ по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуаль-

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

ной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК Mycoplasma hominis/ Mycoplasma genitalium» (комплект 2), следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,

тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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