



669-2 2024-04-22



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Helicobacter pylori*
методом полимеразной цепной реакции

Helicobacter pylori

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2020/12859 от 09 декабря 2020 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 НАЗНАЧЕНИЕ	7
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	8
2.1 СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	8
2.2 Количество анализируемых проб	9
2.3 Принцип метода.....	10
2.4 Время проведения анализа.....	10
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	11
3.1 Аналитическая специфичность.....	11
3.2 Предел обнаружения.....	12
3.3 Диагностические характеристики.....	12
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	13
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	15
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	16
6.1 Материал для исследования	16
6.2 Общие требования	16
6.3 Взятие материала на исследование	16
6.3.1 Биоптаты.....	16
6.3.2 Фекалии	16
6.4 Транспортирование и хранение исследуемых образцов	16
6.5 Подготовка биологического материала для исследования.....	17
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.....	18
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	19
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	18
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U	19
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	21
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	22
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.....	23
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	24
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	25
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	25
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	25
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	26
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	27
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....	28
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	29
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	30

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

НПВС	- нестероидные противовоспалительные средства
ИПП	- ингибиторы протонной помпы
ЖДА	- железодефицитная анемия
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ЯБ	- язвенная болезнь
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
ИВ	- интерферирующие вещества
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ВК	- внутренний контроль
К+	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контрольный образец
ФОН	- контроль фона флуоресценции

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день *Helicobacter pylori* признан ведущим этиопатогенетическим фактором формирования гастродуоденальной патологии у взрослых и детей.

H. pylori имеет широкий набор факторов патогенности, большинство из которых хорошо адаптированы к условиям паразитизма этого микроорганизма в желудке, обеспечивая ему выживание в кислой среде и колонизацию слизистой оболочки. Следствием колонизации является развитие воспалительных процессов, в первую очередь, гастрита и язвенной болезни (ЯБ) желудка и двенадцатиперстной кишки [1; 5; 8].

H. pylori - мелкие, грамотрицательные, неспорообразующие, микроаэрофильные бактерии в форме S-образно или спиралевидно изогнутой палочки с закругленными полюсами; несколько реже встречаются U-образная, V-образная и кокковая формы микроорганизма, что затрудняет его идентификацию при микроскопическом методе исследования [3; 5; 9].

При трансформации *H. pylori* из бациллярной в кокковую форму под действием неблагоприятных факторов внешней среды отмечаются дегенеративные изменения вплоть до перехода в неактивную фазу, что благоприятствует выживанию *H. pylori* и может являться важным фактором в эпидемиологии и распространении бактерий. Кокковые формы теряют ферментативную активность, не поддаются культивированию на искусственных питательных средах, устойчивы к внешним воздействиям, в том числе к действию антибактериальных препаратов, что часто наблюдается у пациентов с осложненными вариантами течения язвенной болезни [3; 9].

В связи с этим использование рекомендованных методов для первичной диагностики инфекции, вызванной *H. pylori*, и оценки эффективности эрадикационной терапии (дыхательный тест с мочевиной, меченной ¹³C, определение антигена *H. pylori* в кале и серологические методы определения антител; для пациентов, у которых имеются показания к проведению эзофагогастродуоденоскопии – быстрый уреазный тест) не всегда позволяет обнаружить кокковые формы бактерии, вследствие чего пациенты с морфологической конверсией *H. pylori* могут быть расценены как успешно пролеченные. В связи с этим целесообразным является введение молекулярно-генетических методов исследования, в первую очередь, полимеразной цепной реакции (ПЦР), поскольку результаты ПЦР-анализа не зависят от культуральных свойств и морфологических особенностей микроорганизма [1; 2; 6].

Показаниями к диагностике инфекции, вызванной *H. pylori*, проведению и последующему контролю эффективности эрадикационной терапии являются [1; 4; 7-8]:

- хронический гастрит, особенно при назначении ингибиторов протонной помпы (ИПП);
- ЯБ желудка и двенадцатиперстной кишки;
- MALT-лимфома желудка;
- планирование и/или проведение эндоскопической резекции на стадии раннего рака желудка;

- гастропатия, индуцированная приемом нестероидных противовоспалительных средств (НПВС);
- функциональная диспепсия;
- аутоиммунная тромбоцитопения;
- рефрактерная железодефицитная анемия (ЖДА).

Для исключения ложноотрицательных результатов контроля эффективности эрадикационной терапии рекомендовано проводить лабораторные исследования не ранее, чем через 4 недели после окончания курса антихеликобактерной терапии, либо после окончания лечения сопутствующих заболеваний любыми антибактериальными препаратами, после приема препарата висмута, и не ранее чем через 2 недели после окончания терапии ИПП и H₂-блокаторами [1-2; 7].

Список литературы

1. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых / В. Т. Ивашкин, И. В. Маев, Т. Л. Лапина и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2018. – Т. 28. – № 1. – С. 55-70.
2. Лабезник, Л. Б. VI национальные рекомендации по диагностике и лечению кислотозависимых и ассоциированных с *Helicobacter pylori* заболеваний (VI МОСКОВСКИЕ СОГЛАШЕНИЯ) / Л. Б. Лабезник, Е. И. Ткаченко, Д. И. Абдулганиева и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – Т. 138. – № 2. – С. 3-21.
3. Назаров, В. Е. Причины безуспешности эрадикационной терапии, не связанные с антибиотикорезистентностью *Helicobacter pylori*, и пути их преодоления // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2018. – № 3. – С. 4-12.
4. Терещенко, С. Ю. Диагностика хронической инфекции *Helicobacter pylori* у детей / С. Ю. Терещенко, И. А. Ольховский // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – № 2. – С. 48-53.
5. Файзуллина, Р. А. Факторы патогенности и вирулентности *Helicobacter pylori* и их роль в развитии хеликобактер-ассоциированной гастродуоденальной патологии / Р. А. Файзуллина, Е. В. Абдуллина // Практическая медицина. – 2011. – Т. 49. – № 1. – С. 74-78.
6. Abadi, A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Using Invasive and Noninvasive Approaches // J Pathog. – 2018. – Vol. 2018. – ID 9064952.
7. Chey, W. D. et al. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection // Am J Gastroenterol. – 2017. – Vol. 112 (2). – P. 212-239.
8. Jones, N. L. et al. Joint ESPGHAN/NASPGHAN Guidelines for the Management of *Helicobacter pylori* in Children and Adolescents (Update 2016) // J Pediatr Gastroenterol Nutr. – 2017. – Vol. 64 (6). – P. 991-1003.
9. Sarem, M., Corti, R. Role of *Helicobacter pylori* coccoid forms in infection and recrudescence // Gastroenterol Hepatol. – 2016. – Vol. 39 (1). – P. 28-35.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для выявления ДНК Helicobacter pylori методом полимеразной цепной реакции (Helicobacter pylori), далее по тексту – набор реагентов.
- 1.2** Набор реагентов предназначен для выявления ДНК Helicobacter pylori методом ПЦР в биологическом материале человека: биоптаты, фекалии.
- 1.3** Функциональное назначение: Изделие предназначено для диагностики in vitro (выявление ДНК Helicobacter pylori методом ПЦР в биологическом материале человека).
- 1.4** Показания к проведению исследования: симптомы инфекционного или воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта, контроль лечения инфекции, вызванной Helicobacter pylori.
- 1.5** Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.
- 1.6** Набор реагентов может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.
- 1.7** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.
- 1.8** Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов Helicobacter pylori выпускается в следующих вариантах исполнения:

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

Варианты исполнения различаются способом детекции амплифицированной ДНК Helicobacter pylori:

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

2.1 Состав набора реагентов

2.1.1 ПЦР с детекцией в режиме реального времени

REF R1-P501-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 Таq-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-P501-23/9, 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 Таq-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-P501-UA/9, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная жидкость от бесцветного до розового цвета	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноTaq 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-P501-51/1, фасовка S, пробирки 0,5 ml			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем 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

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

2.2 Количество 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», включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

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

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов: в режиме реального времени, с флуоресцентной детекцией по конечной точке; 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 смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического 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, используемых для детекции продукта амплификации искомой ДНК, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, используемых для детекции продукта амплификации внутреннего контроля, входит флуоресцентный краситель Hex. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Т а б л и ц а 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow	Rox	Cy5	Cy5.5
Helicobacter pylori	ВК	-	-	-

Исследование с использованием набора реагентов Helicobacter pylori состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК, детекция продуктов амплификации.

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2 часов, в зависимости от используемого набора для выделения ДНК.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК *Helicobacter pylori*, ПЦР-детектор («ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке») или детектирующий амплификатор («ПЦР с детекцией в режиме реального времени») должны регистрировать положительный результат амплификации фрагмента генома *Helicobacter pylori*.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Helicobacter pylori*, ПЦР-детектор или детектирующий амплификатор должны регистрировать отрицательный результат амплификации фрагмента генома *Helicobacter pylori* и положительный результат амплификации внутреннего контроля.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК следующих бактерий:

Рода *Campylobacter*:

Campylobacter showae, *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter sputorum*, *Helicobacter fennelliae*, *Bacteroides ureolyticus*.

Рода *Helicobacter*:

Helicobacter mustelae, *Helicobacter muridarum*, *Helicobacter canis*, *Helicobacter bilis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter trogontum*, *Helicobacter ganmani*, *Helicobacter winghamensis*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter bizzozeronii*, *Helicobacter heilmannii*, *Flexispira rappini*.

Рода *Pseudomonas* spp.:

Pseudomonas putida, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*.

Порядка *Enterobacterales*:

Cronobacter sakazakii, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia rubidaea*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Hafnia alvei*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Providencia alcalifaciens*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas punctata*,

а также ДНК человека в концентрации до $1,0 \times 10^8$ копий/мл образца.

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. 2.3, 9.1.1.4).

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец ДНК, по

результатам анализа рисков и проведения НИОКР отнесены следующие вещества: гемоглобин, присутствующий в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из образца биоматериала, содержащего примесь крови, а также изопропиловый спирт и метилацетат, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось влияние на амплификацию лабораторного контрольного образца и внутреннего контрольного образца, составляют: гемоглобин – 0,35 мг/мл образца ДНК, изопропиловый спирт – 100 мкл/мл образца ДНК, метилацетат – 100 мкл/мл образца ДНК.

Примеси, содержащиеся в образце биоматериала, практически полностью удаляются в ходе выделения ДНК. 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.

3.2 Предел обнаружения:

5 копий ДНК *Helicobacter pylori* на амплификационную пробирку.

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

Концентрация ЛКО, копий на амплификационную пробирку	Количество повторов	Количество положительных результатов	% положительных результатов
5	94	94	100
2	94	79	84

3.3 Диагностические характеристики

Количество образцов (n) – 100.

Диагностическая чувствительность (95% ДИ) – 100% (92,89 – 100%);

Диагностическая специфичность (95% ДИ) – 100% (92,89 – 100%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования клинического материала с соблюдением 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» и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СП 1.3.2322-08 и определяется видом возбудителя, диагностическим методом, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

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

При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька. Использовать только новые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно 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.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение 30 минут.

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.

ВНИМАНИЕ! Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При возникновении контаминации в помещениях лаборатории немедленно останавливают работы и проводят мероприятия по ликвидации контаминации, после чего

проводят внутрилабораторный контроль качества дезинфекции и проведенной деконтаминации ампликонов путём исследования смывов с рабочих поверхностей оборудования и поверхностей помещений.

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

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Вариант исполнения	
	ПЦР с детекцией в режиме реального времени	ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке
Фасовка S		
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ
Раствор Taq-полимеразы	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ
ПЦР-буфер (фон)	-	Нет опасных веществ
Минеральное масло	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	Азид натрия менее 0,1%
Фасовка U		
Смесь для амплификации	Нет опасных веществ	-
Полимераза ТехноTaq MAX	Нет опасных веществ	-
ПЦР-буфер	Нет опасных веществ	-
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	-

В состав набора реагентов входят реагенты, которые содержат **азид натрия** – консервант, в концентрации менее 0,1 %, что является безопасным для конечного пользователя.

При использовании по назначению и соблюдению мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, аллергическая реакция. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не допускается использовать набор реагентов:

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

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ в концентрациях, 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 *Helicobacter pylori* требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Real-time	Flash
ПЦР-бокс	да	да
амплификаторы детектирующие ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), или амплификаторы iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories), Rotor-Gene Q (QiaGen)	да	нет
детектор флуоресцентный «Джин» или «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология»)	нет	да
термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырехканальный «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») или аналогичный	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да	нет
холодильник или холодильная камера	да	да
морозильная камера	да ¹	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,5 мл	нет	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл	да	нет
дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные, позволяющие отбирать объем жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл	да	да
одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл, 1000 мкл;	да	да
пробирки амплификационные объемом 0,2 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да ²	нет
вода дистиллированная	да	да
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да
дезинфицирующее средство	да	да
дозирующее устройство ДТстрим	да ³	нет
устройство для запечатывания планшет ДТпак (ООО «НПО ДНК-Технология»)		
центрифуга для микропланшетов		
полимерная термопленка для запечатывания микропланшетов		
микропланшет ПЦР		
Для взятия и предобработки материала для исследования и выделения НК:		
бокс биологической безопасности II класса;	да	да
термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналогичный с прижимной крышкой, и пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз, или термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 40 °С до 95 °С, и пробирки объемом 1,5 мл с защёлкивающимися крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз, например, Eppendorf Safe-Lock Tubes	да	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да
электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;	да	да
одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора	да	да
центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, с RCF не ниже 16 000 x g	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл	да	да
набор/комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуются ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)	да	да
¹ - используется в фасовке U для хранения полимеразы ТехноТаq МАХ		
² - для фасовки U		
³ - для фасовки U с использованием автоматизированного дозирования		

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют биоптаты, фекалии.

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

6.2 Общие требования

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

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

Неправильное взятие биоматериала может привести к получению недостоверных результатов и, вследствие этого, необходимости его повторного взятия.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СП 1.3.2322-08.

6.3 Взятие материала на исследование

6.3.1 Биоптаты

Перенесите биоптаты в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований. Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК требуется предварительная обработка образцов биологического материала (6.5).

6.3.2 Фекалии

Перенесите ~250 мг (мкл) фекалий в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с 1,0 мл физиологического раствора стерильного. Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК требуется предварительная обработка образцов биологического материала (6.5).

6.4 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

Допускается транспортирование и 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.

6.5 Подготовка биологического материала для исследования.

6.5.1 Биоптаты

6.5.1.1 Встряхните пробирку с биоматериалом в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

6.5.1.2 Удалите надосадочную жидкость.

ВНИМАНИЕ! При выделении ДНК из биоптатов следует использовать только комплекты реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-ГС.

Примечания:

1. При выделении ДНК с помощью комплекта реагентов ПРОБА-НК при выполнении пп. 6.5 – 6.6 (см. инструкцию по применению комплекта реагентов для выделения ДНК ПРОБА-НК) необходимо термостатировать пробирки при 65 °С в течение 30 мин, осадить конденсат центрифугированием в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и перенести надосадочную жидкость в новую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

2. При выделении ДНК с помощью комплекта реагентов ПРОБА-ГС при выполнении пп. 6.2 – 6.7 (см. инструкцию по применению комплекта реагентов для выделения ДНК ПРОБА-ГС) следует добавить в пробирки, содержащие биопсийный материал, 150 мкл лизирующего раствора (без сорбента!), закрыть крышки пробирок, встряхнуть пробирки на микроцентрифуге-вортексе, затем термостатировать пробирки в течение 20 мин при 50 °С, удалить из пробирок нелизированный материал, добавить 20 мкл предварительно ресуспендированного сорбента, закрыть крышки пробирок и встряхнуть пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

6.5.2 Фекалии

6.5.2.1 Встряхните пробирку с фекалиями в 1,0 мл физиологического раствора на микроцентрифуге-вортексе в течение 5-10 с.

6.5.2.2 Центрифугируйте пробирку при 100 x g в течение 2-3 мин.

6.5.2.3 Перенесите 800-1000 мкл надосадочной жидкости в новую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, центрифугируйте при 16 000 x g в течение 10 мин.

6.5.2.4 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

ВНИМАНИЕ! Выделение ДНК из фекалий необходимо проводить с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК.

Дальнейшая обработка указанных выше видов биологического материала осуществляется согласно инструкциям к используемым комплектам реагентов для выделения ДНК.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объеме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

ВНИМАНИЕ! При использовании набора реагентов в фасовке S, стрипы, строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов!

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 варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» промаркируйте дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

Пр и м е р : Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого необходимо:

- «ПЦР с детекцией в режиме реального времени»: 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 Таq-полимеразы в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе 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 Таq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавьте по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).

ВНИМАНИЕ! При использовании для проведения ПЦР прибора Rotor-Gene Q минеральное масло в пробирки не вносится!

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

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

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-ГС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при 16 000 x g в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

2. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок/стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. Препараты ДНК и контрольные образцы 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. 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.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 (при использовании для проведения ПЦР прибора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).

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.5 (Приложение А).

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U

7.3.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых 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 на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

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

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

7.3.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ. Смешайте в отдельной пробирке:

- 6,0 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,3 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТaq МАХ,

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

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

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

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

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

Примечание – После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ в пробирки со смесью для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп.7.3.8 - 7.3.13

7.3.8 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-ГС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при 16 000 x g в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

2. 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 и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

- 7.3.9 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки 6,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»).
- 7.3.10 Внесите в пробирку, промаркированную «К-» 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.7.1).
- 7.3.11 Внесите в пробирку, промаркированную «К+» 6,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.3.12 Центрифугируйте все пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе (при использовании для проведения ПЦР прибора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).
- 7.3.13 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 18 мкл. Программы амплификации для фасовки U приведены в таблицах Б.1-Б4 (Приложение Б).
- 7.4** Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим
- 7.4.1 Встряхните пробирку со смесью для амплификации в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

- 7.4.3 Следуя указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, в отдельной пробирке приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ.
- 7.4.4 Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-ГС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при 16 000 x g в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

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

- 7.4.7 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшет ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.4.8 Запустите процесс запечатывания микропланшет ПЦР термопленкой в соответствии с руководством по эксплуатации к устройству для запечатывания планшет ДТпак.
- 7.4.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при 100 x g в течение 30 с.
- 7.4.10 Установите микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР с учетом объема 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 поместите пробирки 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.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Учет результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором. Интерпретация проводится в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 – Интерпретация результатов исследования

Формат «FLASH»	Формат «Real-time»		Интерпретация
Результат, выданный флуоресцентным детектором «ДЖИН» или «ДЖИН-4»	Результат по каналу детекции Fam/Green (искомая ДНК)	Результат по каналу детекции Hex/Yellow (внутренний контроль)	
Анализируемые образцы			
«+»	Cp/Ct указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК Helicobacter pylori («+»)
«-»	Cp не указан	Cp/Ct указан	Не обнаружена ДНК Helicobacter pylori («-»)
«нд»	Cp не указан	Cp не указан	Недостовверный результат («нд»)
Положительный контрольный образец			
«+»	Cp/Ct указан	Не учитывается	Положительный результат («+») Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец			
«-»	Cp не указан	Cp/Ct указан	Отрицательный результат («-») Результаты постановки валидны

9.1 Недостовверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического 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 биологического материала (выполняется последовательно).

9.2 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 возможной 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 от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.
- 10.1.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка 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 ТехноТaq МАХ, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 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 реагентов.
- 10.2.4 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
- 10.3.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.
- 10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:
- компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
 - 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 защищенном от света месте в течение всего срока годности набора реагентов;
 - полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1** При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов Б и А, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10
- 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 эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 12.2** Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Температурный диапазон
	Количество тестов
	Годен до
	Серия набора реагентов
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению
	Каталожный номер
	Адрес изготовителя
	Не допускается воздействие солнечного света
	Не стерильно
	Одноразовое использование

15 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 Медицинские изделия 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 документа, 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.

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики, и другого лабораторного применения, и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС», ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

Адрес производителя: ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Место производства: ООО «ДНК-Технология ТС»: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для выявления ДНК *Helicobacter pylori* методом полимеразной цепной реакции (*Helicobacter pylori*), следует обращаться по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12,
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

ПЦР с детекцией в режиме реального времени, фасовка S

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

№ 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 ¹	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений
¹ - допускается хранение при температуре 25 °С

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, °C	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, °C	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	0	05 (50)	5
	64,0	0	05 (50)	
3	94,0	0	01 (50)	40
	64,0	0	05 (50)	
4	10,0	Хранение

ПЦР с детекцией в режиме реального времени, фасовка U

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

№ 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 ¹	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений
¹ - допускается хранение при температуре 25 °С

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, °C	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, °C	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

ООО «ДНК-Технология»

117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное,
ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12

Тел./факс +7 (495) 640-17-71

Служба клиентской поддержки:

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

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

E-mail: hotline@dna-technology.ru