



625-3 2024-04-22



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Streptococcus agalactiae*
методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени

Streptococcus agalactiae

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2021/14309 от 13 мая 2021 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	6
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	7
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	9
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	12
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	14
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	16
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	22
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	27
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.....	27
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	28
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	29
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	29
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ.....	29
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	29
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	30
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....	31
ПРИЛОЖЕНИЕ А	33
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	34
ПРИЛОЖЕНИЕ В	35

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

СГВ	- стрептококки группы В
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
ИВ	- интерферирующие вещества
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ВК	- внутренний контроль
К+	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контрольный образец

ВВЕДЕНИЕ

Streptococcus agalactiae относится к грамположительным бактериям рода *Streptococcus* spp. группы В, семейства Streptococcaceae, порядка Lactobacillales.

S. agalactiae распространен повсеместно. Природный резервуар бактерии обширен и включает различные виды млекопитающих, птиц и холоднокровных животных.

Стрептококки группы В (СГВ) колонизируют желудочно-кишечный, урогенитальный тракт, ротовую и носовую полость, однако основным резервуаром считается ЖКТ.

У большей части инфицированных взрослых людей колонизация протекает бессимптомно в виде здорового носительства. Однако *S. agalactiae* вызывает тяжело протекающие заболевания у новорожденных детей и представляет опасность для определенных пациентов других возрастных групп.

СГВ обладают множеством различных факторов патогенности, способствующих выживанию бактерий внутри хозяина, а также развитию инфекционных процессов различной локализации [1].

СГВ может вызывать такие заболевания как остеомиелит, некротизирующий фасциит, миозит, сепсис, пневмония, артрит, менингит, эндокардит и инфекции урогенитального тракта, при этом уровень заболеваемости и смертности растет с увеличением возраста, а также при наличии сердечно-сосудистых заболеваний, снижении иммунитета, онкологических заболеваний [2, 3].

Однако, особое внимание *S. agalactiae* привлекает к себе в связи с резким подъемом заболеваемости новорожденных детей инфекциями, вызванными этим микроорганизмом. До настоящего времени *S. agalactiae* занимает одно из ведущих мест в структуре возбудителей перинатальных инфекций [2].

В подавляющем большинстве случаев новорожденные инфицируются СГВ во время родов от матери, причем чаще это происходит при вагинальном родоразрешении. Риск заболевания доношенного ребенка составляет 1-2%, недоношенного – 15-20%, а при сроке гестации менее 28 недель – практически 100%. СГВ вызывает ранние неонатальные инфекции, такие как сепсис, менингит, пневмония, остеомиелит, артрит и пиелонефрит, частота которых в разных странах колеблется от 0,2 до 5 и более на 1000 живорожденных детей [4].

В акушерской практике с СГВ связывают бактериемию, инфекции мочевых путей, хориоамнионит, преждевременное излитие околоплодных вод, преждевременные роды, послеродовой эндометрит и др. [4].

Обследование на носительство стрептококка группы В и последующая терапия во время беременности помогает выявить колонизацию *S. agalactiae* родовых путей женщины и уменьшить количество рождения детей с признаками внутриутробной инфекции [5].

Оптимальным решением для реализации скрининговых мероприятий и ранней диагностики СГВ-инфекции является метод ПЦР в реальном времени, который характеризуется чувствительностью, специфичностью и высокой скоростью получения результатов исследования. [2, 6].

Список литературы

1. Структура острова патогенности XII стрептококков группы В; Е.В. Кулешевич, диссертация на соискание уч.ст. кандидата биологических наук; Санкт-Петербург, 2015.
2. Диагностика и профилактика инфекций, вызванных *Streptococcus agalactiae*, у беременных и новорожденных; С.Л. Зациорская, А.А. Крысанова, В.О. Хван, З.М. Мартикайнен, А.М. Савичева; Педиатр, том V, № 3, 2014.
3. Prevalence and capsular type distribution of group B *Streptococcus* isolated from vagina of pregnant women in Nghe An province, Vietnam; T.Q. Hanh, V.V. Du, P.T. Hien, D.D. Chinh, C.B. Loi, N.M. Dung, D.N. Anh, T.T.K. Anh; Iran J Microbiol. 2020 Feb; 12(1): 11–17.
4. Микробиологическая диагностика инфекций, вызванных стрептококком группы В у беременных и новорожденных. Клинические рекомендации; А.Р. Мелкумян, Т.В. Припутневич, А.Г. Кочетов, Л.А. Любасовская, А.С. Анкирская, Д.В. Дубоделов, Ю.В. Родченко, В.В. Муравьева, И.С. Тартаковский, А.Н. Цибин, Л.И. Кафарская, Б.А. Ефимов, В.В. Зубков, И.И. Рюмина, Р.Г. Шмаков, С.В. Павлович, Н.Е. Кан, В.Л. Тютюнник, Г.Т. Сухих; Лабораторная служба, 2, 2017.
5. Клинические рекомендации "Нормальная беременность" (утв. Минздравом России). Текст документа приведен в соответствии с публикацией на сайте <http://cr.rosminzdrav.ru/> по состоянию на 13.01.2020.
6. Comparison of LightCycler PCR and culture for detection of group B streptococci from vaginal swabs; M. Convert, G.M. Lucchini, M. Dolina, J.C. Piffaretti; Clin. Microbiol. Infect. 2005; 11: 1022–1026.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

- 1.1** Полное наименование набора: Набор реагентов для выявления ДНК Streptococcus agalactiae методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени (Streptococcus agalactiae), далее по тексту – набор реагентов.
- 1.2** Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК Streptococcus agalactiae (стрептококк группы В) в биологическом материале человека (кровь, мокрота, моча, соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии или меконий, биоптаты, ликвор), в бактериальных культурах из этого биоматериала, в смывах с катетеров и эндотрахеальных трубок методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени.
- 1.3** Функциональное назначение: диагностика *in vitro*, скрининг.
- 1.4** Показания к проведению анализа: скрининг бессимптомного носительства Streptococcus agalactiae или наличие признаков инфекционного заболевания, вызванного Streptococcus agalactiae.
- 1.5** Популяционные, демографические аспекты: исследование беременных женщин и новорожденных детей.
- 1.6** Противопоказаний к применению нет.
- 1.7** Область применения: Набор реагентов может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.
- 1.8** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.
- 1.9** Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P012-S3/4, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	6 шт.		

REF R1-P012-23/4, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем	48 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R1-P012-UA/9, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная жидкость слабо-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

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на 48 определений (фасовка S), что соответствует исследованию не более 46 неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

Набор реагентов в фасовке U рассчитан на проведение в ручном формате 96 определений при условии постановки не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, положительный и отрицательный контрольные образцы) или при использовании дозирующего устройства возможна постановка, предполагающая одновременно 96 определений (94 неизвестных образца, положительный и отрицательный контрольные образцы).

2.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; 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. Для фасовки S «горячий» старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина. Помимо этого, парафин обеспечивает запечатывание реакционной смеси и дополнительную защиту от контаминации ампликонами. «Горячий» старт для фасовки U обеспечивается использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами, активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 94 °С в течение 5 минут. Это 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 состав смеси для амплификации включен внутренний контроль (ВК), который предназначен для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции. В состав ДНК-зонда, используемого для детекции продукта амплификации специфической ДНК, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зонда, используемого 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	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Streptococcus agalactiae	ВК	-	-	-

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов Streptococcus agalactiae.

2.4 Время проведения анализа (исключая пробоподготовку) - от 1,5 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

3.1 Специфичность анализа

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК *S. agalactiae*, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительные результаты амплификации специфического продукта (фрагмента ДНК *S. agalactiae*).

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *S. agalactiae*, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует отрицательные результаты амплификации специфического продукта и положительный результат амплификации внутреннего контроля (ВК).

При исследовании аналитической специфичности показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при исследовании в высокой концентрации ДНК близкородственных микроорганизмов или микроорганизмов потенциально присутствующих в исследуемых образцах: *Streptococcus bovis*, *Streptococcus sanguinis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus anginosus*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. (10^5 - 10^6 КОЭ/мл), и ДНК человека в концентрации более 750 нг на образец.

Показано отсутствие конкурентной ингибиции при исследовании образцов, содержащих неспецифическую ДНК в высокой концентрации и ДНК *S. agalactiae* в низкой.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком полного ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см. раздел 2.3, раздел 9.3).

К ингибиторам ПЦР, которые могут присутствовать в образце ДНК, отнесены следующие эндогенные и экзогенные интерферирующие вещества: гемоглобин, билирубин, холестерин, триглицериды, слизь (муцин) и лекарственные препараты (ИРС-19, назонекс, пиносол, хлоргексидин биглюконат, индометацин суппозитории, ринофлуимуцил, октенисепт), находящиеся в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из образца биоматериала, а также изопропиловый спирт и метилацетат, остающиеся в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось ингибирование ПЦР, представлены в таблице ниже.

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Исследованная концентрация в образце
Эндогенные вещества		
Кровь, фекалии или меконий, моча, соскобы из желудочно-кишечного тракта	Билирубин	684 мкмоль/л
Кровь, фекалии или меконий, соскобы из желудочно-кишечного тракта, ликвор	Холестерин	13 ммоль/л
Кровь, мокрота, соскобы из дыхательных путей, смывы с эндотрахеальных трубок, смывы с катетеров, фекалии или меконий, моча, соскобы из желудочно-кишечного тракта, моча, биоптаты	Гемоглобин	0,35 мг/мл
Кровь, фекалии или меконий, соскобы из желудочно-кишечного тракта	Триглицериды	37 ммоль/л
Мокрота, соскобы из дыхательных путей, соскобы из урогенитального тракта	Слизь (муцин)	20 %
Экзогенные вещества		
Кровь, смывы с катетеров	ЭДТА	до 2,0 мг/мл ¹
Мокрота, соскобы из дыхательных путей	ИРС-19	5%
Мокрота, соскобы из дыхательных путей	Назонекс	2%
Мокрота, соскобы из дыхательных путей	Пиносол	2%
Мокрота, соскобы из дыхательных путей соскобы из урогенитального тракта	Хлоргексидин биглюконат	5%
Фекалии или меконий	Индометацин суппозитории	5%
Мокрота, соскобы из дыхательных путей	Ринофлуимуцил	5%
Мокрота, соскобы из дыхательных путей соскобы из урогенитального тракта	Октенисепт	2%
Кровь, мокрота, соскобы из дыхательных путей, смывы с эндотрахеальных трубок, смывы с катетеров, фекалии или меконий, моча, соскобы из желудочно-кишечного тракта, моча, биоптаты, ликвор, бактериальные культуры	Изопропиловый спирт	10%
Кровь, мокрота, соскобы из дыхательных путей, смывы с эндотрахеальных трубок, смывы с катетеров, фекалии или меконий, моча, соскобы из желудочно-кишечного тракта, моча, биоптаты, ликвор, бактериальные культуры	Метилацетат	10%

При добавлении гепарина в образцы биоматериала (кровь и смывы с катетеров) ингибирование ПЦР наблюдалось при минимально исследованной концентрации интерферента, равной 110 МЕ/дл.

3.3 Предел обнаружения:

Предел обнаружения составляет 5 копий ДНК на амплификационную пробирку. Предел обнаружения установлен путём анализа серийных разведений лабораторного контрольного образца (ЛКО).

¹ - согласно ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл

Предел обнаружения в исследуемом образце зависит от используемого набора (комплекта) реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения) выделенной ДНК, например, соскобы из влагиалища, в 500 мкл транспортной среды:

Комплекты реагентов для выделения ДНК / объем элюции			
ПРОБА-НК / 50	ПРОБА-ГС / 100	ПРОБА-МЧ-РАПИД / 300	ПРОБА-РАПИД / 500
50 копий/образец	100 копий/образец	300 копий/образец	500 копий/образец

3.4 Диагностические характеристики

Вид биоматериала	Чувствительность (95% ДИ)	Специфичность (95% ДИ)
Кровь	100,0 (39,76-100,0)	100,0 (91,40-100,0)
Мокрота	100,0 (47,82-100,0)	100,0 (91,19-100,0)
Соскобы из дыхательных путей	100,0 (54,07-100,0)	100,0 (88,06-100,0)
Смывы с эндотрахеальных трубок	100,0 (59,04-100,0)	100,0 (59,04-100,0)
Смывы с катетеров	100,0 (15,81-100,0)	100,0 (39,76-100,0)
Фекалии или меконий	100,0 (54,07-100,0)	100,0 (88,06-100,0)
Бактериальные культуры	100,0 (80,49-100,0)	100,0 (87,66-100,0)
Моча	100,0 (82,35-100,0)	100,0 (88,78-100,0)
Соскобы из желудочно-кишечного тракта	100,0 (78,20-100,0)	100,0 (88,43-100,0)
Соскобы из уrogenитального тракта	100,0 (63,06-100,0)	100,0 (90,51-100,0)
Биоптаты*	100,0 (69,15-100,0)	100,0 (69,15-100,0)
Ликвор*	100,0 (69,15-100,0)	100,0 (69,15-100,0)
Streptococcus agalactiae	100,0 (96,6-100,0)	100,0 (98,6-100,0)
Примечания:	* - синтетические образцы	

3.5 Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Оценка внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости набора реагентов проведена путём сравнения результатов, полученных при исследовании одних и тех же 24 образцов биоматериала.

Результат	Воспроизводимость			
	Внутрисерийная		Межсерийная	Межсерийная, эквивалентность фасовок
	Фасовка S, стрипы		Фасовка S, стрипы	Фасовка S, пробирки
	Набор 1	Набор 2		
Количество положительных результатов	13	13	13	13
Количество отрицательных результатов	11	11	11	11
Общее количество совпадений результатов	24 из 24			
% совпадения результатов (95%ДИ)	100% (85,7–100%)			

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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».

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

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.

При работе с набором реагентов следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Использовать только одноразовые 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 и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 15-30 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! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Вариант исполнения	
	ПЦР с детекцией в режиме реального времени	
	Фасовка S	Фасовка U
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Нет опасных веществ	-
Раствор Taq-полимеразы	Нет опасных веществ	-
Минеральное масло	Нет опасных веществ	-
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%	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 Streptococcus agalactiae требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U	
	стрипы	пробирки	ручной	автоматизированный
ПЦР-бокс	да	да	да	да
амплификатор детектирующий ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)	да	да	да	да
амплификатор Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)	нет	да	да	нет
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
холодильник или холодильная камера	да	да	да	да
морозильная камера	нет	нет	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл и для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	да	да	да
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объём жидкости от 0,5 до 10 мкл, от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл	да	да	да	нет
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 10 мкл	нет	нет	да	нет
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл	да	да	да	нет
одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да	нет
пробирки объёмом 0,5 мл	нет	нет	да	нет
пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл	нет	нет	да	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да	да
дезинфицирующее средство	да	да	да	да
дозирующее устройство ДТстрим	нет	нет	нет	да
наконечники GEB (Tecan style) AF2000T-H-NS	нет	нет	нет	да
устройство для запечатывания планшет ДТпак	нет	нет	нет	да
центрифуга для микропланшет ПЦР	нет	нет	нет	да
полимерная термопленка для запечатывания микропланшет ПЦР	нет	нет	нет	да
микропланшет ПЦР	нет	нет	нет	да

Для предобработки материала для исследования и выделения ДНК:

- бокс биологической безопасности II класса;
- термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или аналогичный;
- пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз или пробирки объемом 1,5 мл с защёлкивающимися крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз, например, Eppendorf Safe-Lock Tubes;
- электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей (при необходимости удаления надосадочной жидкости);
- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора (при необходимости удаления надосадочной жидкости);
- центрифуга для пробирок объемом 1,5 мл, с RCF не ниже 16 000 x g;
- микроцентрифуга-вортекс;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- физиологический раствор (если необходимо) для подготовки отрицательного контрольного образца;
- вода деионизованная (при необходимости);
- транспортная среда (рекомендуется Транспортная среда для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640);
- набор/комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала, имеющий регистрационное удостоверение медицинского изделия и предназначенный для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР (рекомендуются ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-МЧ-РАПИД производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют кровь, мокроту, мочу, соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии или меконий, биоптаты, ликвор, бактериальные культуры из этого биоматериала, смывы с катетеров и эндотрахеальных трубок.

6.2 Общие требования

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала человека необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса. Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию принимает лечащий врач на основании собранного анамнеза и клинической картины заболевания.

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

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

6.3.1 Периферическая кровь

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. Для перемешивания крови с антикоагулянтом, после взятия материала, необходимо перевернуть пробирку 2-3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.3.2 Ликвор

Взятие спинномозговой жидкости (ликвора) осуществляется одноразовыми иглами в одноразовые пустые пробирки объемом 1,5 мл в количестве не менее 500 мкл согласно установленной процедуре. Пробирки следует плотно закрыть крышкой и промаркировать.

6.3.3 Мокрота

Взятие материала осуществляют в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объёмом не менее 50 мл в количестве не менее 1,0 мл.

После сбора материала флакон плотно закрывают и маркируют.

6.3.4 Моча

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20-30 мл. Отбор мочи проводят в специальную сухую стерильную ёмкость объёмом до 60 мл, снабжённую герметично завинчивающейся крышкой.

После сбора мочи контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.3.5 Соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта

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

После взятия биологического материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований, и тщательно прополощите его в течение 10–15 с, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлеките зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, отожмите избыток жидкости, удалите зонд и выбросьте. Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте.

Примечание – Перед получением соскоба эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала, свободно стекающее отделяемое необходимо удалить стерильным ватным тампоном.

6.3.6 Фекалии или меконий

Для анализа используют пробы фекалий или мекония массой (объёмом) примерно 1–3 г (1–3 мл). Пробу переносят отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками в специальный стерильный сухой флакон в количестве 1 г (примерно).

После сбора фекалий флакон плотно закрывают и маркируют.

6.3.7 Биоптаты

Поместите биоптаты тканей 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.

6.3.8 Смывы с фрагментов венозного катетера

Отрежьте стерильными ножницами 5-10 мм кончика катетера, поместите его в чистую пустую пробирку типа Эппендорф объёмом 1,5 мл.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку. Смывы с венозного катетера получают в лаборатории в ходе обработки материала.

6.3.9 Смывы с эндотрахеальных трубок

Взятие материала производится в пустые одноразовые плотно заворачивающиеся пробирки объёмом 50 мл. После взятия материала пробирку плотно закрывают и маркируют.

6.3.10 Бактериальные культуры

Взятие материала с жидких и плотных сред осуществляется при помощи одноразовой микробиологической петли или шпателя.

Поместите одиночную колонию клеток или 100 мкл жидкой среды в пластиковую пробирку объёмом 1,5-2,0 мл, в которую предварительно внесено 500 мкл физиологического раствора стерильного.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

6.4 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

6.4.1 Кровь, ликвор

Образцы крови и ликвора допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 20 °C до 25 °C – не более 2 часов;
- при температуре от 2 °C до 8 °C – не более 6 часов с момента взятия материала.

ВНИМАНИЕ! Цельную кровь нельзя замораживать.

6.4.2 Мокрота

Образцы мокроты допускается транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) – не более 6 часов;
- при температуре от 2 °C до 8 °C – не более 3 суток.

6.4.3 Нативные и предварительно обработанные образцы мочи:

Нативные и предварительно обработанные образцы мочи допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 2 °C до 8 °C – не более одних суток;
- при температуре от минус 18 °C до минус 20 °C – не более одной недели;
- при температуре минус 70 °C – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.4.4 Соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта

Сроки транспортирования и хранения соскобов из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта определяются инструкциями к рекомендуемым комплектам реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-МЧ-РАПИД) или к транспортной среде.

6.4.5 Образцы нативных фекалий или мекония

Образцы нативных фекалий или мекония допускается транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) – не более 6 часов;
- при температуре от 2 °C до 8 °C – не более 3 суток.

6.4.6 Фрагменты венозных катетеров, смывы с эндотрахеальных трубок, бактериальные культуры, биоптаты

Фрагменты венозных катетеров, смывы с эндотрахеальных трубок, бактериальные культуры, биоптаты допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 2 °C до 8 °C – не более одних суток;
- при температуре от минус 18 °C до минус 20 °C – не более одной недели;
- при температуре минус 70 °C – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.5 Подготовка биологического материала человека для исследования.

ВНИМАНИЕ! Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса центрифугирования. Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.

6.5.1 Кровь

Подготовка образцов крови для исследования проводится согласно инструкции к используемому комплекту/набору реагентов для выделения ДНК (см. 7.1).

6.5.2 Мокрота

6.5.2.1 Способ № 1

1. Перенесите в стерильную посуду примерно 500 мкл биологического материала и плотно закройте крышкой.
2. Добавьте к пробе мокроты равный объём 10 % трехзамещённого фосфорнокислого натрия $x12H_2O$, плотно закройте крышкой и интенсивно встряхните.
3. Инкубируйте смесь при температуре 37 °C в течение 18–24 часов, затем нейтрализуйте 1 М HCl до pH 6,8–7,4.
4. Центрифугируйте при 900 x g в течение 20 мин.
5. Слейте надосадочную жидкость в ёмкость с 5 % раствором хлорамина для обеззараживания.
6. Добавьте к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешайте пипетированием и перенесите в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.
7. Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин.
8. Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке объем (осадок + жидкая фракция), рекомендованный производителем набора (комплекта) реагентов для выделения ДНК из соответствующего биоматериала.

6.5.2.2 Способ № 2

1. Добавьте в контейнер с образцом муколизин в соотношении 5:1 (5 частей муколизина к одной части мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера.
2. Закройте крышку контейнера, встряхните содержимое и инкубируйте 20–30 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C), каждые 2–3 мин встряхивая контейнер.

6.5.3 Моча

- 6.5.3.1 Перенесите в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл 1,0 мл мочи.
 - 6.5.3.2 Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин.
 - 6.5.3.3 Наиболее полно удалите надосадочную жидкость.
 - 6.5.3.4 Добавьте к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного.
 - 6.5.3.5 Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин.
 - 6.5.3.6 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке объем (осадок + жидкая фракция), рекомендованный производителем набора (комплекта) реагентов для выделения ДНК из соответствующего биоматериала.
- 6.5.4 Соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, бактериальные культуры с жидких и плотных сред

- 6.5.4.1 Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин.
- 6.5.4.2 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке объем (осадок + жидкая фракция), рекомендованный производителем набора (комплекта) реагентов для выделения ДНК из соответствующего биоматериала.

6.5.5 Фекалии или меконий – приготовление суспензии.

- 6.5.5.1 Перенесите в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с 1,0 мл физиологического раствора стерильного примерно 0,1-0,2 г (мл) фекалий.
- 6.5.5.2 Тщательно ресуспендируйте содержимое пробирки на вортексе в течение 5-10 с.
- 6.5.5.3 Дальнейшая обработка суспензии проводится в соответствии с инструкцией к используемому набору (комплекту) реагентов для выделения ДНК из соответствующего биоматериала.

6.5.6 Биоптаты

- 6.5.6.1 Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин.
- 6.5.6.2 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке объем (осадок + жидкая фракция), рекомендованный производителем набора (комплекта) реагентов для выделения ДНК из соответствующего биоматериала.

6.5.7 Смывы с эндотрахеальных трубок

- 6.5.7.1 Перенесите в пробирку объемом 1,5 мл с помощью автоматического дозатора, используя наконечник с фильтром, 1,0 мл материала.
- 6.5.7.2 Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин.
- 6.5.7.3 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке объем (осадок + жидкая фракция), рекомендованный производителем набора (комплекта) реагентов для выделения ДНК из соответствующего биоматериала.

6.5.8 Ликвор

- 6.5.8.1 Перенесите в пробирку объёмом 1,5 мл с помощью автоматического дозатора, используя наконечник с фильтром, 500 мкл материала.
- 6.5.8.2 Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин.
- 6.5.8.3 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке объем (осадок + жидкая фракция), рекомендованный производителем набора (комплекта) реагентов для выделения ДНК из соответствующего биоматериала.
- 6.5.9 Фрагменты венозных катетеров (только при использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-НК)
 - 6.5.9.1 Для получения смывов с фрагментов венозных катетеров внесите в пробирку с фрагментом катетера 100 мкл дистиллированной воды или 100 мкл физиологического раствора стерильного.
 - 6.5.9.2 Встряхните пробирку с фрагментом катетера в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
 - 6.5.9.3 Внесите в пробирку 300 мкл лизирующего раствора из комплекта реагентов ПРОБА-НК.
 - 6.5.9.4 Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
 - 6.5.9.5 Термостатируйте пробирку при 65 °C в течение 15 мин.
 - 6.5.9.6 Осадите конденсат центрифугированием в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе и перенесите надосадочную жидкость в новую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

Дальнейшее выделение ДНК проводится, начиная с этапа добавления раствора для преципитации.

Дальнейшая обработка остальных видов исследуемого материала осуществляется согласно инструкциям к используемым комплектам реагентов для выделения ДНК.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала.

Для выделения ДНК рекомендуется использовать комплекты\наборы реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР, например, комплект реагентов ПРОБА-НК, производства ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

Выделение ДНК из исследуемого материала проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту/набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! Выделение ДНК из смывов с фрагментов венозных катетеров рекомендуется проводить с помощью комплекта реагентов ПРОБА-НК (см. 6.5.9).

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав комплекта реагентов для выделения ДНК, в объёме, указанном в инструкции к комплекту реагентов.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР

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

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

7.2.1 Фасовка S

7.2.1.1 Промаркируйте необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином: для исследуемых образцов, для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-».

Пр и м е р : 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.

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

7.2.1.3 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.

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

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

7.2.1.5 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3-5 с 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. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. 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.
3. 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.

- 7.2.1.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»). Закройте плотно пробирки.
- 7.2.1.7 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1). Закройте плотно пробирку.
- 7.2.1.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина 5,0 мкл положительного контрольного образца. Закройте плотно пробирку.
- 7.2.1.9 Центрифугируйте все пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе (при использовании для проведения ПЦР прибора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).
- 7.2.1.10 Установите все пробирки в блок амплификатора. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите установочный файл. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл. При выборе этих тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице А.1 (Приложение А). Для прибора Rotor-Gene Q используется программа, указанная в таблице А.2 (Приложение А).

Тесты для приборов «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96» предоставляются производителем набора реагентов.

7.2.2 Фасовка U, ручное дозирование

7.2.2.1 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.

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

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

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

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

7.2.2.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ. Для этого 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.

7.2.2.6 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.

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

Примечание – После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ в пробирки со смесью для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп.7.2.2.8 - 7.2.2.13

7.2.2.8 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3-5 с 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. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. 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.

3. 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.

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

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

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

7.2.2.12 Центрифугируйте все пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе (при использовании для проведения ПЦР прибора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).

7.2.2.13 Установите все пробирки в блок амплификатора. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите установочный файл. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл. При выборе этих тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице Б.1 (Приложение Б). Для прибора Rotor-Gene Q используется программа, указанная в таблице Б.2 (Приложение Б).

Тесты для приборов «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96» предоставляются производителем набора реагентов.

7.2.3 Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим

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

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

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

- 7.2.3.3 Следуя указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, в отдельной пробирке приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ.
- 7.2.3.4 Встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.2.3.5 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3-5 с 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. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. 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.
- 7.2.3.6 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.
 - 7.2.3.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
 - 7.2.3.8 Проведите процедуру запечатывания микропланшет ПЦР полимерной термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.
 - 7.2.3.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при 500 x g в течение 30 с.
 - 7.2.3.10 Установите микропланшет ПЦР в блок амплификатора. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите установочный файл. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест и проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл. При выборе этих тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице Б.1 (Приложение Б).

Тесты для приборов «ДТпрайм», «ДТлайт» и «ДТ-96» предоставляются производителем набора реагентов.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

- 8.1** Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.
- 8.2** Детекция и учёт результатов осуществляются детектирующим амплификатором автоматически.
- 8.3** После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов. На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла по всем используемым каналам для каждой пробирки в термоблоке.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

- 9.1** Учёт и регистрация результатов реакции осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.
- 9.2** После завершения ПЦР программа отображает в таблице в графе «Результат»: «+» или «-». В этом случае выдается заключение по результатам исследования.
- 9.3** Учёт и интерпретация результатов реакции
- 9.3.1** Для образцов, для которых получены отрицательные результаты по двум каналам детекции, в графе «Результат» будет указано «нд» (недостовверный результат). В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).
- 9.3.2** Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены результаты, приведенные в таблице 2.

Т а б л и ц а 2 – Результаты исследования отрицательного и положительного контрольных образцов

Канал детекции		Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex		
Положительный контрольный образец			
Значение Cp указано	Значение не учитывается	+	Результат положительный Результаты постановки валидны
Отрицательный контрольный образец			
Значение Cp не указано	Значение Cp указано	-	Результат отрицательный Результаты постановки валидны

- 9.3.3** Принципы интерпретации результатов исследования приведены в таблице приложения В.
- 9.3.4** При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.
- 9.3.5** При получении для положительного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

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 реагентов.
- 10.1.2 Допускается транспортирование в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера от 2 °С до 25 °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.
- 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 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:
- 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;
 - 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.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 11.1** При использовании набора реагентов в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684 и МУ 1.3.2569.
- 11.2** Изделия, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 12.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 12.2** Срок годности набора реагентов – 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		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до		Не допускается воздействие солнечного света
	Серия набора реагентов		Не стерильно
	Дата изготовления		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: 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 *Streptococcus agalactiae*, 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, www.dna-technology.ru

ПЦР с детекцией в режиме реального времени, фасовка S

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

ДТ 30%						
№ 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, °C /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 °C

ПЦР с детекцией в режиме реального времени, фасовка U

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

№ блока	Температура, °C	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 °C

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

№ /Cycling	Температура, °C /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 °C

Принципы интерпретации результатов исследования

Учет и регистрация проводятся программным обеспечением автоматически. В данном приложении изложены общие принципы интерпретации результатов.

Выбранный флуорофор		Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex		
Анализируемые образцы			
Значение Ср указано	Значение Ср не учитывается	+	Обнаружена ДНК Streptococcus agalactiae
Значение Ср не указано	Значение Ср указано	-	Не обнаружена ДНК Streptococcus agalactiae
Значение Ср не указано	Значение Ср не указано	нд	Недостовверный результат*
* - требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно)			