



440-5 2025-02-19



ИНСТРУКЦИЯ

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

ПЛАЗМОГЕН-Мг

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/02550 от 17 февраля 2025 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	5
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	6
2.1 Состав набора реагентов.....	6
2.2 Количество анализируемых образцов.....	7
2.3 Принцип метода	7
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
3.1 Аналитическая специфичность	8
3.2 Интерферирующие вещества	8
3.3 Предел обнаружения	9
3.4 Диагностические характеристики.....	9
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	10
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	12
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	14
6.1 Материал для исследования	14
6.2 Общие требования	14
6.3 Взятие материала на исследование	15
6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала	18
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	19
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	19
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	19
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	22
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	26
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	27
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	28
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	29
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	30
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	30
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	30
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	31
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	32
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	33
Приложение А.....	34
Приложение Б.....	35

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
ВК	- внутренний контроль
ДИ	- доверительный интервал
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКазы	- дезоксирибонуклеазы
К–	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК)
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНКаза	- рибонуклеаза

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jensen J.S., Cusini M., Gomberg M, Moi H. Background review for the 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016 Oct; 30(10):1686-1693.
2. Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Jensen JS. The biology of *Mycoplasma genitalium*. Venereology 2000; 13: 119–127.
3. Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM, Rose DL. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. Lancet 1981; 1: 1288– 1291.
4. Cohen CR, Manhart LE, Bukusi EA et al. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. Lancet 2002; 359: 765– 766.
5. Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK et al. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. J Infect Dis 2003; 187: 650–657.
6. Cohen CR, Mugo NR, Astete SG et al. Detection of *Mycoplasma genitalium* in women with laparoscopically diagnosed acute salpingitis. Sex Transm Infect 2005; 81: 463–466.
7. Anagrus C, Lore B, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. Sex Transm Infect 2005; 81: 458–462.
8. Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2015; 61: 418–426.
9. Oakeshott P, Hay P, Taylor-Robinson D et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in early pregnancy and relationship between its presence and pregnancy outcome. BJOG 2004; 111: 1464–1467.
10. Salado-Rasmussen K, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium* testing pattern and macrolide resistance: a Danish nationwide retrospective survey. Clin Infect Dis 2014; 59: 24–30.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК микоплазмы гениталиум (*Mycoplasma genitalium*) методом полимеразной цепной реакции (ПЛАЗМОГЕН-Мг), далее по тексту – набор реагентов.

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

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

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

Противопоказаний к применению нет.

1.5 Популяционные и демографические аспекты: применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6 Область применения: набор реагентов может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

1.7 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории: врач клинко-диагностической лаборатории, фельдшер-лаборант (медицинский лабораторный техник).

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P103-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая 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 ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов	12 шт.		

REF R1-P103-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая 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 ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

REF R1-P103-UA/9, фасовка U			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

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

Комплектность:

- Набор реагентов в одном из вариантов исполнения – 1 шт.
- Инструкция по применению – 1 экз.
- Вкладыш – 1 экз.
- Паспорт – 1 экз.

¹ – на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+»

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 96 определений (не более 24 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Набор реагентов в фасовке U рассчитан на проведение 96 определений при условии постановки не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный 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 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов 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, который обеспечивается для фасовки S методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки. «Горячий» старт для фасовки U обеспечивается использованием полимеразы, активность которой блокирована антителами, активация фермента происходит только после предварительного прогрева реакционной смеси при 94 °С. Это исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную 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 детектирующим амплификатором.

Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав смеси для амплификации включен внутренний контроль (ВК), который предназначен для контроля 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 NheX. В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow/Vic	Rox/Orange	Cy5/Red	Cy5.5/Crimson
<i>Mycoplasma genitalium</i>	BK	–	–	–

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация ДНК в режиме реального времени с использованием набора реагентов ПЛАЗМОГЕН-Мг.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК *Mycoplasma genitalium*, программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта (фрагмента ДНК *Mycoplasma genitalium*) по каналу детекции Fam/Green.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Mycoplasma genitalium*, детектирующий амплификатор должен регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Mycoplasma genitalium*) по каналу детекции Fam/Green и положительный результат амплификации внутреннего контроля по каналу детекции Hex/Yellow/Vic.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., а также ДНК человека в концентрации до $1,0 \times 10^8$ копий/мл образца.

3.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых/недостоверных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта.

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

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

3.3 Предел обнаружения:

5 копий ДНК *Mycoplasma genitalium* на амплификационную пробирку.

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

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

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

Пример:

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

Образец	Наборы/комплекты для выделения нуклеиновых кислот			
	ПРОБА-НК	ПРОБА-ГС	ПРОБА-МЧ-РАПИД (при элюции в 300 мкл)	ПРОБА-РАПИД
- Соскоб эпителиальных клеток в 500 мкл транспортной среды; - Эякулят в 500 мкл транспортной среды; - Секрет простаты в 500 мкл транспортной среды; - Моча (при выделении из 1,0 мл образца)	50 копий/образец	100 копий/образец	300 копий/образец	500 копий/образец

3.4 Диагностические характеристики

Количество образцов (n) – 398;

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

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

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р ИСО 15190-2023, 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 санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

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

При работе с микроорганизмами I–IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

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

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

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

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов 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 помещения, в которых проводится выделение НК и постановка ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок 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 и нормами СанПиН 3.3686-21.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации, так как это может привести к контаминации продуктами ПЦР (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями санитарных правил и норм СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента		Указание на риски
	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%	Не классифицируется как опасный для здоровья человека и окружающей среды

При работе с набором реагентов следует использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Не 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 набора реагентов.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов 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 требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы ¹	пробирки	ручное	автоматизированное
ПЦР-бокс	да	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ²	да	да	да	да ³
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл	нет	да	да	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да	да	да
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объём жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл	да	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл	да	да	да	да
одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом, 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да	да
пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	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
Устройство дозирующее ДТстрим по ТУ 9443-005-96301278-2012 в варианте исполнения 12M1 или 15M1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, далее по тексту – ДТстрим	нет	нет	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *M1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	нет	нет	да
Устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия	нет	нет	нет	да
центрифуга с RCF (g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	нет	нет	да
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов	нет	нет	нет	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	нет	нет	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)				
транспортная среда (при необходимости), рекомендуются:				
– Транспортная среда для биопроб STOP-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640;				
– Транспортная среда для биопроб с муколитиком (STOP-M) по ТУ 21.20.23-102-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2019/9453 (для соскобов эпителиальных клеток из урогенитального тракта)				

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы ¹	пробирки	ручное	автоматизированное
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала ⁴ , рекомендуются: – Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС по ТУ 9398-035-46482062-2009 в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; – Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в форме комплектации: ПРОБА-ГС, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08696; – Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-МЧ по ТУ 9398-088-46482062-2016 в форме комплектации ПРОБА-МЧ-РАПИД, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2017/5753; – Комплект реагентов для выделения ДНК ПРОБА-РАПИД по ТУ 9398-015-46482062-2008, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2008/02939.				
Примечания к таблице: ¹ – не используется для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q ² – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже ³ – валидирован детектирующий амплификатор «ДТпрайм» (модификация ДТпрайм *Х*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 ⁴ – возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i> определяется видом биологического материала (7.1).				

Набор реагентов применяется с детектирующими амплификаторами планшетного и роторного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированными в установленном порядке в РФ и соответствующими следующим требованиям:

- обеспечивается работа с объемом реакционной смеси 35 мкл (фасовка S) или 18 мкл (фасовка U);
- обеспечивается работа с флуорофорами: Fam, Hex (Vic);
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/с;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/с;
- точность поддержания и однородность температуры не более $\pm 0,4$ °С.

Для работы с набором реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229, далее по тексту – «ДТпрайм»;
- Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 (модификация «ДТпрайм *Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования), далее по тексту – «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм *Х*»;
- Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010 (модификация «ДТлайт *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228 (только для набора реагентов в фасовке S; в фасовке U для ручного дозирования), далее по тексту – «ДТлайт»;

- Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 (только для набора реагентов в фасовке S, пробирки; в фасовке U для ручного дозирования), далее по тексту – Rotor-Gene Q;
- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96), Био-Рад Лабораториз, Инк; США, РУ № ФСЗ 2008/03399, далее по тексту – CFX96;
- Амплификатор нуклеиновых кислот Applied Biosystems QuantStudio 5 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.», Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446, далее по тексту – Applied Biosystems QuantStudio 5.

По вопросам применения детектирующих амплификаторов, не указанных выше, требуется согласование с производителем набора реагентов.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта, мочу, секрет простаты, эякулят.

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.

На этапе подготовки биоматериала используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

Для предотвращения контаминации открывайте крышку только той пробирки, в которую будете вносить биологический материал, и закрывайте ее перед работой со следующей пробиркой.

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 СанПин 3.3686-21.

6.3 Взятие материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед выделением ДНК может потребоваться подготовка образцов биологического материала.

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

Ограничение метода¹: местное применение лекарственных препаратов, использование лубрикантов, УЗИ вагинальным датчиком, кольпоскопия – менее чем за 24 часа до исследования.

Взятие соскобов проводится:

- в одноразовые пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл, в которые предварительно внесено 300–500 мкл стерильного физиологического раствора;
- в пробирки с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований;
- в пробирки с реактивом «ПРОБА-РАПИД» (производитель ООО «ДНК-Технология ТС»).

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

ВНИМАНИЕ! Взятие материала в пробирки с реактивом «ПРОБА-РАПИД» осуществляется сухим зондом! Необходимо **исключить** контакт растворов с кожей, глазами и слизистыми оболочками.

Порядок взятия:

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

ВНИМАНИЕ! Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч. Предобработку, пробоподготовку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту/набору реагентов для выделения ДНК из биологического материала.

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

¹ – если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплексам реагентов для выделения НК

4.1 Пробирку, содержащую анализируемый материал, центрифугируйте при 13000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

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

Полученный материал готов для выделения ДНК.

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

6.3.1.1 Особенности взятия урогенитальных соскобов

Женщины накануне обследования не должны проводить туалет половых органов и спринцевание. Для получения объективного результата необходимо, чтобы исследуемый материал содержал возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи и примеси крови.

ВНИМАНИЕ! Перед получением соскоба эпителиальных клеток из уретры, с заднего свода влагалища и цервикального канала свободно стекающее отделяемое необходимо удалить стерильным ватным тампоном.

При необходимости взятия биоматериала из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал новым зондом в новую пробирку.

6.3.1.2 Особенности взятия материала из влагалища

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

6.3.1.3 Особенности взятия материала из уретры

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

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

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

6.3.1.4 Особенности взятия материала из цервикального канала

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

6.3.2 Первая порция утренней мочи

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

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

Взятие мочи проводят в специальный сухой стерильный контейнер объёмом до 60 мл, снабжённый герметично закручивающейся крышкой.

После сбора мочи контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.3.3 Секрет простаты (предстательной железы)

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

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

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

Взятие выделившегося простатического секрета проводится после окончания массажа в одноразовую пробирку объёмом 2,0 мл или контейнер объёмом до 60 мл в виде свободно стекающей капли (0,15–1,0 мл).

После сбора материала ёмкость с секретом простаты плотно закрывают и маркируют.

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

6.3.4 Эякулят

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

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

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

Эякулят получают путем мастурбации. Взятие эякулята проводится в стерильный контейнер объёмом до 60 мл, снабжённый герметично закручивающейся крышкой.

После сбора материала контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

Условия транспортирования и хранения образцов биологического материала определяются инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения ДНК (7.1) или используемых для транспортирования и хранения образцов транспортных сред.

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С в течение одного месяца (если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектam реагентов для выделения НК).

ВНИМАНИЕ! Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения на медицинское изделие и предназначенные для соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования ДНК методом ПЦР, например, ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-РАПИД.

Примечание – Не рекомендуется использовать комплект реагентов ПРОБА-РАПИД при выделении ДНК из соскобов из урогенитального тракта мужчин.

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией по применению используемого набора/комплекта реагентов.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. Для этого рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот в объеме, указанном в инструкции по применению соответствующего набора/комплекта реагентов.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!
2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы» следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 24 постановки при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Пример:

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

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

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

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

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

7.2.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-РАПИД и ПРОБА-ГС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки), необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

3. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Необходимо закрывать пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К–» и «К+», ДНК не вносится.

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 Центрифугируйте все пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с (при использовании для проведения ПЦР детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).

7.2.10 Установите все пробирки/стрипы в детектирующий амплификатор.

7.2.11 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.2.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

7.2.12 Для детектирующих амплификаторов Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:

Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 3, 4, 5 соответственно.

Таблица 2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка S)

№ 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	25 ²	...	...	Хранение		Хранение
√ – режим оптических измерений						

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А) или предоставляется производителем набора реагентов

² – допускается хранение при температуре 10 °C

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q (фасовка S, пробирки)

№ / 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 детекции Green (Fam) и Yellow (Hex) при 57 °C

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96 (фасовки S, U)

№ блока (Step)	Температура, °C	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
1	80	01:00	1
2	94	01:30	1
3	94	00:15	50
4	64 √	00:20	

√ – режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex) при 64 °C

Таблица 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов Applied Biosystems QuantStudio 5 (фасовки S, U)

Стадия	№ шага	Температура, °C	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
Стадия удержания	1	80	01:00	1
	2	94	01:30	1
Стадия ПЦР	1	94	00:20	50
	2	64 √	00:20	

√ – сбор данных для необходимых флуорофоров (Fam, Vic (Hex)) включен

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование

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

7.3.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых амплификационных пробирок объемом 0,2 мл для неизвестных образцов, для отрицательного контрольного образца (K-) и для положительного контрольного образца (K+).

Примечание – Рекомендуется постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

Пример:

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

- 7.3.2 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.3.3 Внесите во все промаркированные пробирки (включая «К-» и «К+») по 6,0 мкл смеси для амплификации.
- 7.3.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.3.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ. Для этого смешайте в отдельной одноразовой 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 неизвестных образца, «К-», «К+». Промаркированных пробирок – 6. Нужно 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 с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ необходимо готовить непосредственно перед использованием.

- 7.3.7 Добавьте во все промаркированные пробирки со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ. Неплотно закройте пробирки.

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

- 7.3.8 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
 2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-РАПИД и ПРОБА-ГС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки), необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
 3. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
 4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Необходимо закрывать пробирки плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.
- 7.3.9 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К–» и «К+», ДНК не вносится.
- 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 на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с (при использовании для проведения ПЦР детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).
- 7.3.13 Установите все пробирки в детектирующий амплификатор и проведите ПЦР (7.3.14, 7.3.15).
- 7.3.14 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:
Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов

количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см.7.3.13) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 6.

7.3.15 Для детектирующих амплификаторов CFX96, Applied Biosystems QuantStudio 5 и Rotor-Gene Q:

Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 4, 5, 7 соответственно.

Таблица 6 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка U)

№ 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	25 ¹	...	...	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

Таблица 7 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q (фасовка U)

№ / 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 детекции Green (Fam) и Yellow (Hex) при 57 °C

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора «ДТпрайм» в модификации «ДТпрайм *X*»)

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать микропланшеты ПЦР 384 лунки, герметизируемые термоплёнкой.
2. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

Примечание – Рекомендуется постановка не менее 5 образцов в одном исследовании (3 неизвестных образца, отрицательный и положительный контрольные образцы).

- 7.4.1 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.4.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq МАХ необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

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

ВНИМАНИЕ!

1. Перед проведением дозирования для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.
2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-РАПИД и ПРОБА-ГС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки), необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
3. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения

надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

- 7.4.6 Установите пробирки со смесью для амплификации, со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ, с препаратами ДНК, отрицательным контрольным образцом и положительным 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 планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.4.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.
- 7.4.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.
- 7.4.10 Установите микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора.
- 7.4.11 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.4.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 6.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

¹ – тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов

9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Учёт результатов амплификации осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2 При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Subtraction» необходимо выбрать «Baseline Subtraction Curve Fit».

9.3 Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 8. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 8 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции		Интерпретация результата
Fam/Green, Cp/Cq/Ct	Hex/Yellow/Vic, Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы		
Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i>
Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i>
Не указан	Не указан	Недостоверный результат
Отрицательный контрольный образец		
Не указан	Указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец		
Указан	Не учитывается	Положительный результат Результаты постановки валидны

9.4 Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР для этого образца, либо повторное взятие биологического материала у пациента (выполняется последовательно).

9.5 При получении положительного результата для отрицательного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

9.6 При получении отрицательного результата для положительного контрольного образца результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае 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 внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2 Фасовка S

Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °C до 25 °C не более 5 суток.

10.1.3 Фасовка U

10.1.3.1 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq MAX, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °C до 25 °C не более 5 суток.

10.1.3.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq MAX в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °C не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Фасовка S

Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2 Фасовка U

10.2.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq MAX, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2.2 Полимеразу ТехноТaq MAX следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °C до минус 18 °C в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.3 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 достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

- все 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 защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 22 °С до минус 18 °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 класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, повреждением упаковки, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПин 2.1.3684-21.

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 однократного применения и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов
	Использовать до
	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Номер по каталогу
	Изготовитель
	Не допускать воздействия солнечного света
	Нестерильно

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ ISO 14971-2021 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям

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

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Общие требования к текстовым документам

ГОСТ Р 15.013-2016 Система разработки и постановки продукции на производство (СРПП). Медицинские изделия

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 ИСО 15190-2023 Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

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

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

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

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

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

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 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: 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

- ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4;
- ООО «НПО ДНК-Технология», 142281, Россия, Московская область, г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.

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,

www.dna-technology.ru

Приложение А

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов ПЛАЗМОГЕН-Мг
в фасовке S**

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объём реакционной смеси – 35 мкл;
- 3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ блока	Температура, °C	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	25 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ – режим оптических измерений						

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Mycoplasma genitalium</i>	БК	–	–	–

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C

Приложение Б

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов ПЛАЗМОГЕН-Мг
в фасовке U**

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объем реакционной смеси – 18 мкл;
- 3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ 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	25 ¹	...	...	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Mycoplasma genitalium</i>	ВК	–	–	–

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C