



441-5 2025-02-28



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК уреаплазмы уреалитикум и парвум
(*Ureaplasma urealyticum* - *Ureaplasma parvum*) и их дифференциации
методом полимеразной цепной реакции

ПЛАЗМОГЕН-УП

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2009/04072 от 19 февраля 2025 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ	7
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	8
2.1 Состав набора реагентов	8
2.2 Количество анализируемых образцов	11
2.3 Принцип метода	11
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	13
3.1 Аналитическая специфичность	13
3.2 Интерферирующие вещества	14
3.3 Предел обнаружения	14
3.4 Диагностические характеристики	16
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	17
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	19
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	22
6.1 Материал для исследования	22
6.2 Общие требования	22
6.3 Взятие материала на исследование	22
6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала	25
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	26
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	26
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	26
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	29
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	33
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	34
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	35
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	36
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	37
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	37
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	37
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	38
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	39
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	40
Приложение А	41
Приложение Б	42

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
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путём
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
МАНК	- методы амплификации нуклеиновых кислот
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК)
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНКазы	- рибонуклеазы

ВВЕДЕНИЕ

Уреаплазмы - самые маленькие бактерии, не имеющие клеточной стенки, и ограниченными биосинтетическими возможностями, принадлежат к классу *Mollicutes* [1].

Уреаплазмы, имеющие медицинское значение, подразделяют на два отдельных вида: *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum*, которые могут участвовать в инфекциях мочеполовых путей у женщин [2] и мужчин [2,3] и связаны с осложнениями беременности и такими осложнениями у новорожденных, как бронхолегочная дисплазия и менингит [1-7]. У мужчин уреаплазмы не только могут являться причиной уретрита [3], но также поражать более высокие отделы мочеполовой системы, являясь причиной репродуктивных нарушений у мужчин [8, 9] или участвовать в развитии хронического простатита [10,11,12].

Недавно было установлено, что виды *Ureaplasma* связаны с фатальной гипераммонемией у пациентов с трансплантацией легких [13]. Кроме того, некоторые авторы полагают, что уреаплазменная инфекция может быть вовлечена и в другие необъяснимые синдромы гипераммонемии [14]. В последние годы виды уреаплазмы признаны важными патогенами, не только в связи с их потенциальной патогенностью, связанной с урогенитальным трактом или внутриутробными инфекциями, но также и с их способностью вызывать системные заболевания у новорожденных и у иммуносупрессированных пациентов [1-7, 13, 15, 16].

Диагностирование *Ureaplasma* выполняют с помощью методов классического культивирования, калориметрического метода и методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) [17,18]. Для того, чтобы избежать ложноотрицательных результатов для культивационных методов критичным является правильный сбор биоматериала. Поскольку у микроорганизма отсутствует клеточная стенка, он чувствителен к высушиванию и нагреванию: аспиры или соскобы должны быть сразу помещены в транспортную среду и на льду доставлены в лабораторию. Получение результата может занимать от 24-48 ч до 7 дней. В США, например, существуют лишь несколько лабораторий, которые могут получить культуры *Ureaplasma* [17].

Для облегчения определения *Ureaplasma spp.* имеются коммерчески доступные диагностические комплекты для колориметрической диагностики, требующие менее квалифицированный персонал и более быстрое время обнаружения, они имеют чувствительность и специфичность, сравнимые с культуральным методом и методами ПЦР [19-21]. Эти наборы реагентов также позволяют проводить количественное определение микроорганизма и антибиотическую чувствительность, но не определяют вида *Ureaplasma*.

Тесты на основе МАНК, как обычный ПЦР с детекцией электрофорезом, так и реал-тайм ПЦР, обеспечивают возможность дифференцирования сероваров *Ureaplasma* и обнаруживать на 15% больше положительных образцов, чем культуральный метод исследования [22].

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. 2005. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 18:757–789. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.18.4.757-789.2005>.
2. Fernández J, Karau MJ, Cunningham SA, Greenwood-Quaintance KE, Patel R. Antimicrobial Susceptibility and Clonality of Clinical Ureaplasma Isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jul 22; 60(8):4793-8.
3. Deguchi T., Yoshida T., Miyazawa T., et al. Association of Ureaplasma urealyticum (biovar 2) with nongonococcal urethritis. *Sex Transm Dis*. 2004; 31:192–195.
4. Fonseca LT, Silveira RC, Procianoy RS. 2011. Ureaplasma bacteremia in very low birth weight infants in Brazil. *Pediatr Infect Dis J* 30:1052–1055.
5. Gwee A, Chinnappan M, Starr M, Curtis N, Pellicano Bryant. 2013. Ureaplasma meningitis and subdural collections in a neonate. *Pediatr Infect Dis J* 32:1043–1044.
6. Capoccia R, Greub G, Baud D. 2013. Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis and adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis* 26:231–240.
7. Biran V, Dumitrescu AM, Doit C, et al. Ureaplasma parvum meningitis in a full-term newborn. *Pediatr Infect Dis J*, 2010, 29:1154.
8. Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L et al. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl*. 2008 Mar-Apr; 29(2):198-206.
9. Zeighami H, Peerayeh SN, Yazdi RS, Sorouri R. Prevalence of Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum in semen of infertile and healthy men. *Int J STD AIDS*. 2009 Jun; 20(6):387-90.
10. Irajian G, Sharifi M, Mirkalantari S et al. Molecular Detection of Ureaplasma urealyticum from Prostate Tissues using PCR-RFLP, Tehran, Iran. *Iran J Pathol*. 2016 Spring; 11(2):138-43.
11. Park H, Lee G. Roles of Ureaplasma Species in Idiopathic Chronic Prostatitis: A Case-Control Study. *World J Mens Health*. 2019 Feb 12.
12. Wang SX, Zhang JM, Wu K et al. [Pathogens in expressed prostatic secretion and their correlation with serum prostate specific antigen: analysis of 320 cases]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2014 Aug; 20(8):715-8.
13. Bharat A, Cunningham SA, Budinger GRS, et al. Disseminated Ureaplasma infection as a cause of fatal hyperammonemia in humans. *Sci Transl Med*, 2015, 7:284re3.
14. Beeton ML. Possible missed diagnosis of Ureaplasma spp infection in a case of fatal hyperammonemia after repeat renal transplantation. *J Clin Anesth* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinane.2015.08.019>.
15. Eilers E, Moter A, Bollmann R, et al. Intrarenal abscesses due to Ureaplasma urealyticum in a transplanted kidney. *J Clin Microbiol*, 2007, 45:1066 –1068.

16. Gelfand E.W. Unique susceptibility of patients with antibody deficiency to mycoplasma infection. *Clin Infect Dis.* 1993; 17(Suppl 1):S250-S253. [PubMed].
17. Viscardi RM, Kallapur SG. Role of Ureaplasma Respiratory Tract Colonization in Bronchopulmonary Dysplasia Pathogenesis: Current Concepts and Update. *Clin Perinatol.* 2015 Dec; 42(4):719-38.
18. Waites KB, Xiao L, Paralanov V, et al. Molecular methods for the detection of Mycoplasma and ureaplasma infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2012; 14:437-50.
19. Cheah FC, Anderson TP, Darlow BA, et al. Comparison of the Mycoplasma Duo test with PCR for detection of ureaplasma species in endotracheal aspirates from premature infants. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:509-10.
20. Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, et al. Comparison of the new Mycofast Revolution assay with a molecular assay for the detection of genital mycoplasmas from clinical specimens. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:453.
21. del Machado LP, Molinari MA, dos Santos L, et al. Performance of four commercial kits for laboratory diagnosis of urogenital mollicute infection. *Can J Microbiol.* 2014; 60:613-7.
22. Xiao L, Glass JI, Paralanov V, et al. Detection and characterization of human ureaplasma species and serovars by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:2715-23.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК уреаплазмы уреалитикум и парвум (*Ureaplasma urealyticum* - *Ureaplasma parvum*) и их дифференциации методом полимеразной цепной реакции (ПЛАЗМОГЕН-УП), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК уреаплазмы уреалитикум и парвум (*Ureaplasma urealyticum* - *Ureaplasma parvum*) и их дифференциации методом ПЦР в биологическом материале человека: соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта, моча, секрет простаты, эякулят.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению исследования: симптомы инфекционного или воспалительного заболевания мочеполовой системы у женщин и у мужчин, контроль лечения инфекции, вызванной *Ureaplasma urealyticum* и/или *Ureaplasma parvum*.

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 клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

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

2.1.1 Уреаплазма уреалитикум и парвум (*Ureaplasma urealyticum* – *Ureaplasma parvum*)

REF R1-P104-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём 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-P104-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём 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-P104-UA/9, фасовка U			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

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

2.1.2 Уреаплазма уреалитикум (*Ureaplasma urealyticum*)

REF R1-P106-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём 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-P106-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём 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-P106-UA/9, фасовка U			
Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

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

2.1.3 Уреаплазма парвум (*Ureaplasma parvum*).
REF R1-P105-S3/9, фасовка S, стрипы

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём 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-P105-23/9, фасовка S, пробирки

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём 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-P105-UA/9, фасовка U

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТаq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Положительный контрольный образец 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 Таq-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°C. 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, использующихся для детекции продукта амплификации искомой ДНК, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации внутреннего контроля, входит флуоресцентный краситель Hex. В таблицах 1-3 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

Таблица 1 – Уреаплазма уреалитикум и парвум (*Ureaplasma urealyticum* – *Ureaplasma parvum*). Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow/Vic	Rox/Orange	Cy5/Red	Cy5.5/Crimson
<i>Ureaplasma urealyticum</i> – <i>Ureaplasma parvum</i>	ВК	-	-	-

Таблица 2 – Уреаплазма уреалитикум (*Ureaplasma urealyticum*). Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow/Vic	Rox/Orange	Cy5/Red	Cy5.5/Crimson
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	ВК	-	-	-

Таблица 3 – Уреаплазма парвум (*Ureaplasma parvum*). Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow/Vic	Rox/Orange	Cy5/Red	Cy5.5/Crimson
<i>Ureaplasma parvum</i>	ВК	-	-	-

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК уреаплазмы уреалитикум и/или парвум (*Ureaplasma urealyticum* и/или *Ureaplasma parvum*) с детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов ПЛАЗМОГЕН-УП.

Набор реагентов в варианте исполнения Уреаплазма уреалитикум и парвум (*Ureaplasma urealyticum* – *Ureaplasma parvum*) предназначен для скринингового выявления ДНК уреаплазмы уреалитикум и/или парвум (*Ureaplasma urealyticum* и/или *Ureaplasma parvum*) без дифференциации, для дифференциации ДНК уреаплазмы уреалитикум и парвум (*Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum*) необходимо использование набора реагентов в вариантах исполнения Уреаплазма уреалитикум (*Ureaplasma urealyticum*) и Уреаплазма парвум (*Ureaplasma parvum*).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

3.1.1 Уреаплазма уреалитикум и парвум (*Ureaplasma urealyticum* – *Ureaplasma parvum*).

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК *Ureaplasma urealyticum* и/или *Ureaplasma parvum*, программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Ureaplasma urealyticum* и/или *Ureaplasma parvum*) по каналу детекции Fam/Green.

В образцах биологического материала, не содержащих ни ДНК *Ureaplasma urealyticum*, ни ДНК *Ureaplasma parvum*, программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагментов геномов *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum*) по каналу детекции Fam/Green и положительный результат внутреннего контроля по каналу детекции Hex/Yellow/Vic.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *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.

3.1.2 Уреаплазма уреалитикум (*Ureaplasma urealyticum*).

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

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Ureaplasma urealyticum*, программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательный результат наличия специфического продукта (фрагмента генома *Ureaplasma urealyticum*) по каналу детекции Fam/Green и положительный результат внутреннего контроля по каналу детекции Hex/Yellow/Vic.

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

3.1.3 Уреаплазма парвум (*Ureaplasma parvum*).

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК *Ureaplasma parvum*, программное обеспечение детектирующего амплификатора («ПЦР с детекцией в режиме реального времени») должно регистрировать положительный результат наличия специфического продукта (фрагмента генома *Ureaplasma parvum*) по каналу детекции Fam/Green.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Ureaplasma parvum*, программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательный результат наличия специфического продукта (фрагмента генома *Ureaplasma parvum*) по каналу детекции Fam/Green и положительный результат внутреннего контроля по каналу детекции Hex/Yellow/Vic.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *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 (см. 2.3, 9.3, 9.4).

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

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

Кроме того, потенциально оказывать влияние на результаты ПЦР способны содержащиеся в образце биоматериала лубриканты и 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

3.3.1 Уреаплазма уреалитикум и парвум (*Ureaplasma urealyticum* – *Ureaplasma parvum*):

10 копий ДНК *Ureaplasma urealyticum* или *Ureaplasma parvum* 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
20	94	94	100
10	94	94	100
5	94	83	88,3
2	94	72	76,6
0	94	0	0

3.3.2 Уреаплазма уреалитикум (*Ureaplasma urealyticum*):

10 копий ДНК *Ureaplasma urealyticum* 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
20	94	94	100
10	94	94	100
5	94	86	91,5
2	94	76	80,8
0	94	0	0

3.3.3 Уреаплазма парвум (*Ureaplasma parvum*):

10 копий ДНК *Ureaplasma parvum* 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
20	94	94	100
10	94	94	100
5	94	80	85,1
2	94	62	65,9
0	94	0	0

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

П р и м е р :

Предел обнаружения 10 копий ДНК на амплификационную пробирку соответствует следующим значениям концентрации ДНК 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-ГС-ПЛЮС	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)	100 копий/образец	200 копий/образец	600 копий/образец	600 копий/образец	1000 копий/образец

3.4 Диагностические характеристики:

Количество образцов (n) – 298.

Диагностические характеристики	Варианты исполнения		
	Уреаплазма уреалитикум и парвум (Ureaplasma urealyticum – Ureaplasma parvum)	Уреаплазма уреалитикум (Ureaplasma urealyticum)	Уреаплазма парвум (Ureaplasma parvum)
Диагностическая чувствительность (95% ДИ)	99,1% (96,0; 99,9)	100% (95,4; 100)	97,9% (91,1; 99,8)
Диагностическая специфичность (95% ДИ)	99,5% (97,7; 100)	99,6% (98,2; 99,6)	99,6% (98,3; 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 клинико-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 промаркованы.

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 Таq-полимеразы	Нет опасных веществ	-	-
Минеральное масло	Нет опасных веществ	-	-
Смесь для амплификации	-	Нет опасных веществ	-
Полимераза ТехноТаq 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	
	стрипсы 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 ДТстриим по ТУ 9443-005-96301278-2012 в варианте исполнения 12М1 или 15М1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982, далее по тексту – ДТстриим	нет	нет	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстриим в комплектации *М1, 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

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипсы ¹	пробирки	ручное	автоматизированное
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)				
транспортная среда (при необходимости), рекомендуются:				
<ul style="list-style-type: none"> - Транспортная среда для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640; - Транспортная среда для биопроб с муколитиком (СТОР-М) по ТУ 21.20.23-102-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2019/9453 (для соскобов эпителиальных клеток из урогенитального тракта) 				
набор/комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала ⁴ , рекомендуются:				
<ul style="list-style-type: none"> - 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 формах комплектации: ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, 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 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 объёмом реакционной смеси 35 мкл (фасовка S) или 18 мкл (фасовка U);
- обеспечивается работа с флуорофорами: Fam, Hex (Vic);
- подогреваемая крышка с температурой более 100 °C;
- скорость нагрева не менее 2 °C/c;
- скорость охлаждения не менее 1 °C/c;
- точность поддержания и однородность температуры не более ± 0,4 °C.

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 Лабораториез, 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 Технолоджис 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, регламентирующими 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 объемом 1,5 мл, в которые предварительно внесено 300-500 мкл стерильного физиологического раствора;

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

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

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

ВНИМАНИЕ! Взятие материала в пробирки с реагентом «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 реагентом «ПРОБА-РАПИД», и тщательно прополоските 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 сосков в пробирки с физиологическим раствором или транспортной средой перед выделением ДНК комплектами ПРОБА-ГС или ПРОБА-НК выполните предобработку:

- 4.1 Пробирку, содержащую анализируемый материал, центрифугируйте при 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 + жидккая фракция) при использовании для выделения комплекта реагентов ПРОБА-ГС или 100 мкл (осадок + жидккая фракция) при использовании для выделения комплекта реагентов ПРОБА-НК. Пробирки плотно закройте крышками.

Полученный материал готов для выделения ДНК.

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

6.3.1.1 Особенности взятия урогенитальных сосков

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 объемом до 60 мл, снабженный герметично завинчивающейся 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 проводят 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 завинчивающейся 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 °C до 8 °C 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 °C до минус 18 °C в течение одного месяца (если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектам 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-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-РАПИД.

П р и м е ч а н и е – Не рекомендуется использовать комплект реагентов ПРОБА-РАПИД при выделении ДНК из сосков 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 объёме, 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 вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

П р и м е р :

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 Таq-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 Таq-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/стрипсы 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, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС (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/стрипсы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.
- 7.2.6 Внесите в соответствующие промаркованные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркованные «К-» и «К+», ДНК не вносится.
- 7.2.7 Внесите в пробирку, промаркованную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.7.1).

- 7.2.8 Внесите в пробирку, промаркованную «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 4.
- 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 5, 6, 7 соответственно.

Таблица 4 – 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 предоставляемся производителем набора реагентов

² - допускается хранение при температуре 10 °С

Таблица 5 – 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 6 – 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 7 – 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 объёмом 0,2 мл для неизвестных образцов, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

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 ТехноТақ MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТақ MAX необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.3.5 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТақ MAX. Для этого смешайте в отдельной одноразовой пробирке:
 - 6,0 x (N+1) мкл ПЦР-буфера;
 - 0,3 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТақ MAX,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 ТехноТақ MAX для 7 (6+1) пробирок, т.е. 42 мкл ПЦР-буфера + 2,1 мкл полимеразы ТехноТақ MAX.

- 7.3.6 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ MAX необходимо готовить непосредственно перед использованием.

- 7.3.7 Добавьте в пробирки со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ MAX. Неплотно закройте пробирки.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТақ MAX 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, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС (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 промаркованные пробирки по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркованные «К-» и «К+», ДНК не вносится.

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

7.3.11 Внесите в пробирку, промаркованную «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

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

постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите 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 8.

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 6, 7, 9 соответственно.

Таблица 8 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка U)

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		✓	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		✓	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25 ¹	Хранение		Хранение

✓ - режим оптических измерений

Таблица 9 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q (фасовка U)

№ / Cycling	Температура, °С / Temperature	Время, с / Hold Time, s	Количество циклов / Cycle Repeats
Cycling	80 deg	60	1 time
	94 deg	300	
Cycling 2	94 deg	30	5 times
	57 deg ✓	15	
Cycling 3	94 deg	10	45 times
	57 deg ✓	15	

✓ - режим оптических измерений, установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам детекции Green (Fam) и Yellow (Hex) при 57 °С

¹ - допускается хранение при температуре 10 °С

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

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 ТехноТаq MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТаq MAX 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 ТехноТаq MAX.
- 7.4.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq MAX 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, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС (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 ТехноТақ MAX, 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 8.

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 предоставляемся 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 10. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 10 – 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>Ureaplasma urealyticum</i> и/или <i>Ureaplasma parvum</i>
Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i> и/или <i>Ureaplasma parvum</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 ТехноТаq 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 ТехноТаq 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 ТехноТаq 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 ТехноТаq 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 ТехноТақ MAX, 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 ТехноТақ MAX 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

IVD	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Температурный диапазон
	Содержимого достаточно для проведения <н> тестов
	Использовать до
LOT	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
REF	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. Общие требования к текстовым документам

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

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

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. 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 использовании 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-УП
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>Ureaplasma urealyticum</i> и/или <i>Ureaplasma parvum</i>	BK	-	-	-

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-УП
в фасовке У**

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

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		✓	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		✓	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25 ¹	Хранение		Хранение

✓ - режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Ureaplasma urealyticum</i> и/или <i>Ureaplasma parvum</i>	ВК	-	-	-

¹ - допускается хранение при температуре 10 °С