



438-5 2024-06-28



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК хламидии трахоматис (*Chlamydia trachomatis*)
методом полимеразной цепной реакции

ХЛАМИ-ГЕН

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03890 от 25 июня 2024 года

Digitally signed by Ceaicovschi Tudor
Date: 2026.01.22 17:53:35 EET
Reason: MoldSign Signature
Location: Moldova

MOLDOVA EUROPEANĂ



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	8
2.4 Время проведения анализа	9
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
3.1 Аналитическая специфичность	9
3.2 Интерферирующие вещества	9
3.3 Предел обнаружения	10
3.4 Диагностические характеристики.....	10
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	11
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	13
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	15
6.1 Материал для исследования	15
6.2 Общие требования	15
6.3 Взятие материала на исследование	16
6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала	19
6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК	19
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	20
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	20
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	20
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	25
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	28
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	30
8.1 Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора.....	30
8.2 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов	30
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	31
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	32
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	33
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	33
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	33
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	34
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	35
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	36
Приложение А.....	37
Приложение Б.....	38

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

RCF	- 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
РНКазы	- рибонуклеазы

ВВЕДЕНИЕ

Хламидия трахоматис (*Chlamydia trachomatis*) является патогенным микроорганизмом, относится к возбудителям инфекций, передаваемых половым путем.

Наиболее часто хламидийная инфекция поражает органы половой системы. Хламидийная инфекция может протекать как с клиническими симптомами, так и бессимптомно, однако независимо от наличия симптомов следствием хламидийной инфекции являются серьезные осложнения в виде нарушений репродуктивной функции и развитии мужского и женского бесплодия. Заражение происходит во время половых контактов или при рождении ребенка через инфицированные половые пути.

Более редко хламидийная инфекция поражает прямую кишку, ротоглотку, конъюнктиву глаз.

Применение набора реагентов для выявления ДНК хламидии трахоматис (*Chlamydia trachomatis*) ХЛАМИ-ГЕН позволяет своевременно выявить возбудителя и назначить лечение, в том числе и с использованием специфических препаратов. Набор реагентов ХЛАМИ-ГЕН может использоваться для контроля успешности лечения путем повторных исследований. Отрицательный результат исследования позволяет исключить хламидиоз при проведении дифференциальной диагностики заболеваний.

Список литературы

1. Lanjouw E, Ouburg S, de Vries HJ et al. 2015 European guideline on the management of *Chlamydia trachomatis* infections. International Journal of STD & AIDS 2015; 0(0) 1–16.
2. Kent CK, Chaw JK, Wong W, et al. Prevalence of rectal, urethral, and pharyngeal chlamydia and gonorrhea detected in 2 clinical settings among men who have sex with men: San Francisco, California, 2003. Clin Infect Dis 2005; 41: 67–74.
3. Joki-Korpela P, Sahrakorpi N, Halttunen M, et al. The role of *Chlamydia trachomatis* infection in male infertility. Fertil Steril 2009; 91: 1448–1450.
4. Pinsky L, Chiarilli DB, Klausner JD, et al. Rates of asymptomatic nonurethral gonorrhea and chlamydia in a population of university men who have sex with men. J Am Coll Health 2012; 60: 481–484.
5. Hu VH, Harding-Esch EM, Burton MJ, et al. Epidemiology and control of trachoma: Systematic review. Trop Med Int Health 2010; 15: 673–691.
6. Darville T. *Chlamydia trachomatis* infections in neonates and young children. Semin Pediatr Infect Dis 2005; 16: 235–244.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК хламидии трахоматис (*Chlamydia trachomatis*) методом полимеразной цепной реакции (ХЛАМИ-ГЕН), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК хламидии трахоматис (*Chlamydia trachomatis*) методом ПЦР в биологическом материале человека: соскобы эпителиальных клеток (из урогенитального тракта, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаза), моча, секрет простаты, эякулят.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению исследования: симптомы инфекционного или воспалительного заболевания мочеполового тракта, кишечника, ротоглотки, глаз, контроль лечения хламидиоза.

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.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов ХЛАМИ-ГЕН выпускается в следующих вариантах исполнения:

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

Варианты исполнения различаются способом детекции амплифицированной ДНК *Chlamydia trachomatis*:

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

2.1 Состав набора реагентов

2.1.1 ПЦР с детекцией в режиме реального времени

REF R1-P101-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	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 Taq-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-P101-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	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 Taq-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

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

REF R1-P101-UA/9, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТaq 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

2.1.2 ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке

REF F1-P101-51/1, фасовка S, пробирки 0,5 mL			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	100 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
ПЦР-буфер (фон)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец 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.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 96 определений для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» и 100 определений для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке», включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов, положительных контрольных образцов и фоновых пробирок. Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» предусмотрено не более 24 постановок, для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» - не более 10 постановок.

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

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, с флуоресцентной детекцией по конечной точке; 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°C. Это исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт 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 или ПЦР-детектором.

Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в варианте исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» или после проведения амплификации в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке».

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 Nhe. 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>Chlamydia trachomatis</i>	ВК	-	-	-

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК *Chlamydia trachomatis* и детекция продуктов амплификации с использованием набора реагентов ХЛАМИ-ГЕН. При использовании наборов реагентов в варианте исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» этапы ПЦР-амплификации ДНК и детекции ДНК совмещены.

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора/комплекта для выделения ДНК).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

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

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Chlamydia trachomatis*, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должен регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Chlamydia trachomatis*) и положительный результат амплификации внутреннего контроля.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *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 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 *Chlamydia trachomatis* 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	82	87
0	94	0	0,0

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

Например: Предел обнаружения 5 копий на амплификационную пробирку соответствует следующим значениям концентрации ДНК *Chlamydia trachomatis* при использовании комплектов для выделения нуклеиновых кислот производства ООО «НПО ДНК-Технология»:

Образец	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) – 488;

Диагностическая чувствительность составляет (95% ДИ) – 98,5% (94,1-98,5%);

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ) – 100% (99,3-100%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением 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 клинко-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	-	-
ПЦР-буфер (фон)	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%	Является безопасным для конечного пользователя

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 исключен.

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	Real-time		Flash
	Фасовка S	Фасовка U	
ПЦР-бокс	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	нет
Детектор флуоресценции ДФ-520/560-«ДЖИН», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01274 Детектор флуоресцентный «ДЖИН-4», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01249	нет	нет	да
Термостат программируемый ТП4-ПЦР-01-«Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ №ФСР 2007/01275	нет	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да ²	да	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл	да ³	да ⁴	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да ²	нет	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,5 мл	нет	нет	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да
пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл с крышками	нет	да ⁴	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да
транспортная среда (при необходимости)	да	да	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)	да	да	да

¹ - далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже

² - только для фасовки S, стрипы

³ - только для фасовки S, пробирки

⁴ - только для ручного дозирования

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Real-time		Flash
	Фасовка S	Фасовка U	
Устройство дозирующее ДТстрим в варианте исполнения 12M1 или 15M1 ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982	нет	да ¹	нет
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *M1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	да ¹	нет
устройство для запечатывания планшет ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология»	нет	да ¹	нет
центрифуга с RCF (g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	да ¹	нет
полимерная термопленка для запечатывания микропланшетов 384 лунки	нет	да ¹	нет
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да ¹	нет
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала ² : - Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС по ТУ 9398-035-46482062-2009 в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; - Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в форме комплектации: ПРОБА-ГС, ООО «НПО ДНК-Технология», 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 «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2008/02939			

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/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек;
- точность поддержания и однородность температуры не более $\pm 0,4$ °С.

В ходе клинических испытаний валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229;

¹ - только для автоматизированного дозирования

² - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК *Chlamydia trachomatis* определяется видом биологического материала

- «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования);
- «ДТлайт» (модификация «ДТлайт *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228;
- Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 (только для набора реагентов в фасовке S, пробирки; в фасовке U для ручного дозирования при использовании пробирок);
- CFX96, Био-Рад Лабораториес, Инк; США, РУ № ФСЗ 2008/03399;
- Applied Biosystems QuantStudio 5, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.», Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446.

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, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаза), 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 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 предварительная обработка образцов биологического материала (6.5).

6.3.1 Соскобное отделяемое урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры), ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаза

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий (в зависимости от источника биологического материала), имеющих регистрационные удостоверения, согласно установленной процедуре.

ВНИМАНИЕ! Использование цитощёток для взятия соскобов из урогенитального тракта противопоказано при беременности.

Ограничение метода¹:

при взятии соскобов из урогенитального тракта – местное применение лекарственных препаратов, УЗИ вагинальным датчиком менее чем за 24 часа до исследования;

при взятии ректальных соскобов - использование ректальных свечей, слабительных препаратов, медикаментов, содержащих высокий процент железа, кольпоскопия менее чем за 48 часов 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 «НПО ДНК-Технология»).

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.

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

¹ - если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектam реагентов для выделения НК

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.

6.3.1.5 Особенности взятия материала с конъюнктивы глаза

При наличии обильного гнойного отделяемого его убирают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором. Соскоб берут с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. При взятии соскоба необходимо придерживать веко руками, чтобы при моргании ресницы не касались зонда.

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 Остаточная моча после массажа простаты

Перед взятием остаточной мочи после массажа простаты рекомендуется половое воздержание в течение трех суток до исследования.

Пациент мочится в туалете, оставляя часть мочи в мочевом пузыре.

Перед сбором мочи головку полового члена обрабатывают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

Пациенту проводят массаж предстательной железы в течение 1–3 минут. Интенсивность массажа зависит от консистенции простаты: при мягкой предстательной железе осуществляют несильные надавливания, при плотной консистенции простаты силу давления увеличивают.

Сбор остаточной мочи осуществляется пациентом после окончания массажа. Взятие первой порции мочи проводится в сухой стерильный контейнер объёмом до 60 мл, снабжённый герметично закручивающейся крышкой, в количестве 10–15 мл.

После сбора материала контейнер плотно закрывают и маркируют.

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

6.3.5 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 рекомендуемых наборов/комплектов реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-РАПИД) 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 18 °С до минус 22 °С 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.

6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия 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, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+). При использовании набора реагентов в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» промаркируйте дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

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 (вариант исполнения «Real-time») или не более чем на 10 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца, 1 положительного контрольного образца и 2 пробирок «ФОН» (вариант исполнения «Flash») в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого нужно:

- «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» (Real-time): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.
- «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» (Flash): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-», одну пробирку для «К+», две пробирки «ФОН». Общее количество пробирок – 8.

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 в каждую пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. Добавьте в пробирки, промаркированные «ФОН», по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).

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. Закройте пробирки/стрипы.

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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 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 с препаратом ДНК 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. Закрывайте 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-», «К+» и «ФОН», ДНК не вносится.

7.2.7 Внесите в пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

Примечание – Готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии набора реагентов при условии использования того же набора/комплекта реагентов для выделения ДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение одного месяца. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (от 18 °С до 25 °С), для этого за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

7.2.8 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 программируемый термостат/амплификатор или в детектирующий амплификатор.

7.2.11 Для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке»: Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, в режиме, приведённом в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для амплификаторов с активным регулированием (например, программируемый термостат Терцик). Время в скобках указано для амплификаторов без активного регулирования.

№ п.п.	Температура, °С	Время		Количество циклов
		мин	с	
1	94,0	1	00	1
2	94,0	0	05 (50)	5
	64,0	0	05 (50)	
	67,0	0	05 (50)	
3	94,0	0	01 (50)	40
	64,0	0	05 (50)	
	67,0	0	05 (50)	
4	10,0	...	...	Хранение

Примечание – Более подробное описание программирования и управления программируемым термостатом «Терцик» содержится в инструкции по эксплуатации прибора (см. «Руководство пользователя»).

7.2.12 Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени»:

Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение 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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

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

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 4, 5, 6 соответственно.

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

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка S)

№ 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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

Таблица 4 – 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 5 – 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	0:15	50
4	64 √	0:20	

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

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

Таблица 6 – 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	0:20	50
	2	64 ✓	0:20	
✓ - 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 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 ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq 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 в пробирки со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ. 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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 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 с препаратом ДНК 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. Закрывайте 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 количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.
- 7.3.15 Для детектирующих амплификаторов CFX96, Applied Biosystems QuantStudio 5 и Rotor-Gene Q:
Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 5, 6, 8 соответственно.

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

Таблица 7 – 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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

Таблица 8 – 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			

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора ДТпрайм)

ВНИМАНИЕ! 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.

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

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

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 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 с препаратом ДНК 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, отрицательными контрольными образцами и положительными контрольными образцами, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

- 7.4.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет в подложку устройства для запечатывания планшет ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.4.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термопленкой согласно инструкции к прибору 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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора

После прохождения реакции амплификации поместите пробирки в ПЦР-детектор, оформите протокол и проведите регистрацию результатов в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

8.2 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов

Регистрация сигнала флуоресценции на детектирующих амплификаторах серии ДТ, Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5 проводится 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 ПЦР-детектором или 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 9. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 9 – Интерпретация результатов ПЦР

Flash	Real-time		Интерпретация результата
Результат, полученный на флуоресцентном детекторе «ДЖИН» или «ДЖИН-4»	Канал детекции Fam/Green (искомая ДНК), Cp/Cq/Ct	Канал детекции Hex/Yellow/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы			
«+»	Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> («+»)
«-»	Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> («-»)
«нд»	Не указан	Не указан	Недостовверный результат («нд»)
Отрицательный контрольный образец			
«-»	Не указан	Указан	Отрицательный результат («-») Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец			
«+»	Указан	Не учитывается	Положительный результат («+») Результаты постановки валидны

9.4 Недостовверный 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 необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение ДНК и постановку ПЦР для этого образца, либо 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 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U) в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25°С не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

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

10.2.4 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 Для получения 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 (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °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.

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>
	Предел температуры
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> тестов
	Использовать до
	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению
	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 приемка 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 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 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. 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:

- 1) ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.
- 2) 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

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов ХЛАМИ-ГЕН
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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy 5	Cy 5.5
<i>Chlamydia trachomatis</i>	ВК	-	-	-

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

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

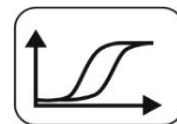
- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объем реакционной смеси – 18 мкл;
- 3) В окне «Программа амплификации» ввести следующие параметры:

№ 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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy 5	Cy 5.5
<i>Chlamydia trachomatis</i>	BK	-	-	

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C



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 материала⁴, 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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



441-5 2025-02-28



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК уреоплазмы 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
РНКазаы	- 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: аспираты 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 антимикробную 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 уреоплазмы 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 уреоплазмы уреалитикум и парвум (*Ureaplasma urealyticum* - *Ureaplasma parvum*) и их дифференциации 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 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 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

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 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 Taq-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 объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-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 объем компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноTaq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Положительный контрольный образец 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 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 Taq-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 объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-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 объем компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноTaq MAX	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	1 пробирка	30 мкл
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	600 мкл
Положительный контрольный образец ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл

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

2.1.3 Уреаплазма парвум (*Ureaplasma parvum*).

REF R1-P105-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-P105-23/9, 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-P105-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 «K+»

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°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 Nhe. 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>	БК	-	-	-

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>	БК	-	-	-

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>	БК	-	-	-

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 объема выделенной ДНК (объема элюции).

Пример:

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 уреаплазм и парвум (Ureaplasma urealyticum – Ureaplasma parvum)	Уреаплазма уреаплазм (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 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	автоматизи- рованное
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
ротатор 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

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы ¹	пробирки	ручное	автоматизированное
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)				
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 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 °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 Лабораториес, 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 объемом 1,5 мл, в которые предварительно внесено 300-500 мкл стерильного физиологического раствора;

¹ - если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектam реагентов для выделения НК

- 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 уrogenитального 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:
 - 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 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 °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/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-ПЛУС, 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, 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/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 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, °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 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 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 объемом 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 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 в 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, 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 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

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, °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 9 – 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 *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 – Рекомендуются 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, 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 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 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 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 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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. 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 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-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, °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 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 °C

Приложение Б

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов ПЛАЗМОГЕН-УП
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>Ureaplasma urealyticum</i> и/или <i>Ureaplasma parvum</i>	ВК	-	-	-

¹ - допускается хранение при температуре 10 °C

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК гарднереллы вагиналис (*Gardnerella vaginalis*)
методом полимеразной цепной реакции

ГАРД-ГЕН

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03846 от 25 июня 2024 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ	6
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	7
2.1 Состав набора реагентов	7
2.2 Количество анализируемых образцов	8
2.3 Принцип метода	9
2.4 Время проведения анализа	10
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
3.1 Аналитическая специфичность	10
3.2 Интерферирующие вещества	10
3.3 Предел обнаружения	11
3.4 Диагностические характеристики	11
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	12
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	14
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	17
6.1 Материал для исследования	17
6.2 Общие требования	17
6.3 Взятие материала на исследование	17
6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала	20
6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК	20
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	21
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	21
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	21
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	26
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	29
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	31
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	32
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	33
10.1 Транспортирование	33
10.2 Хранение	34
10.3 Указания по эксплуатации	34
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	35
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	35
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	35
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	36
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	37
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	38
Приложение А	39
Приложение Б	40
Приложение В	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
БВ	- бактериальный вагиноз
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	- рибонуклеазы

ВВЕДЕНИЕ

Gardnerella vaginalis - наиболее изученный вагинальный анаэроб, который наряду с другими анаэробными бактериями, участвует в развитии бактериального вагиноза (БВ) у женщин [1,2,3] и может вызывать воспалительные заболевания нижних отделов мочеполовых путей у мужчин [4,5,6].

Классическими симптомами бактериального вагиноза считаются жидкие прозрачные, белые или серые гомогенные выделения с неприятным запахом, отсутствие вагинита, однако лишь около 50% женщин с БВ имеют характерные симптомы, часто клинические симптомы отсутствуют или неспецифичны для БВ, у многих женщин БВ протекает бессимптомно.

Осложнениями БВ являются воспалительные заболевания органов малого таза (эндометрит, сальпингит, tuboовариальный абсцесс) [7, 8, 9]. БВ является фактором риска инфекционных осложнений при медицинских и спонтанных абортах.

Беременные женщины с БВ имеют более высокий риск преждевременного разрыва околоплодных оболочек и преждевременного рождения детей с низким весом [10], а также развития послеродового эндометрита.

Низкая чувствительность стандартных методов диагностики и появление новых методов идентификации микроорганизмов на основе амплификации нуклеиновых кислот, методов, обладающих чувствительностью, близкой к 100%, позволило сделать заключение об их эффективности для идентификации *Gardnerella vaginalis* и своевременно назначать соответствующую терапию.

Список литературы

1. Srinivasan S., Hoffman N.G., Morgan M.T., Matsen F.A., Fiedler T.L., Hall R.W., et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. PLoS One. 2012; 7(6) doi: 10.1371/journal.pone.0037818.
2. Fredricks D.N., Fiedler T.L., Thomas K., Oakley B.B., Marrazzo J.M. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 2007; 45:3270–3276.
3. Zozaya-Hinchliffe M., Lillis R., Martin D.H., Ferris M.J. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 2010; 48:1812–1819.
4. Horner P.J., Blee K., Falk L., Meijden W., Moi H. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. Int J STD AIDS, 2016 Oct; 27(11):928-37.
5. Keane F.E., Thomas B.J., Whitaker L., et al. An association between non-gonococcal urethritis and bacterial vaginosis and the implications for patients and their sexual partners. Genitourin Med 1997; 73:373–7.
6. Kinghorn G.R., Jones B.M., Chowdhury F.H., Geary I. Balanoposthitis associated with Gardnerella vaginalis infection in men. Br J Vener Dis 1982; 58:127-9.
7. Hillier S.L., Kiviat N.B., Hawes S.E. et al. Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis. Am J Obstet Gynecol. 1996; 175:435–441.
8. Larsson P.G., Bergmann B., Forsum U. et al. Treatment of bacterial vaginosis in women with vaginal bleeding complications or discharge and harboring Mobiluncus. Gynecol Obstet Invest. 1990; 29:296–300.
9. Swidsinski A., Verstraelen H., Loening-Baucke V. et al. Presence of a polymicrobial endometrial biofilm in patients with bacterial vaginosis. PLoS One. 2013; 8:e53997. [PMCID: PMC3540019].
10. McGregor J.A., French J.L., Seo K. Premature rupture of the membranes and bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol. 1993; 169:463–466.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

- 1.1** Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК гарднереллы вагиналис (*Gardnerella vaginalis*) методом полимеразной цепной реакции (ГАРД-ГЕН), далее по тексту – набор реагентов.
- 1.2** Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК гарднереллы вагиналис (*Gardnerella vaginalis*) 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 мочепоолового тракта, контроль лечения инфекции, вызванной *Gardnerella vaginalis*.
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

Набор реагентов ГАРД-ГЕН выпускается в следующих вариантах исполнения:

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

Варианты исполнения различаются способом детекции амплифицированной ДНК *Gardnerella vaginalis*:

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

2.1 Состав набора реагентов

2.1.1 ПЦР с детекцией в режиме реального времени

REF R1-P108-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	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-P108-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	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

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

REF R1-P108-UA/9, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТaq 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

2.1.2 ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке

REF F1-P108-51/1, фасовка S, пробирки 0,5 mL			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	100 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
ПЦР-буфер (фон)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец 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.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 96 определений для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» и 100 определений для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке», включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов, положительных контрольных образцов и фоновых пробирок. Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» предусмотрено не более 24 постановок, для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» - не более 10 постановок.

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

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, с флуоресцентной детекцией по конечной точке; 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 несёт 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 или ПЦР-детектором.

Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в варианте исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» или после проведения амплификации в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке».

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 Нех. 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>Gardnerella vaginalis</i>	ВК	-	-	-

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК *Gardnerella vaginalis* и детекция продуктов амплификации с использованием набора реагентов ГАРД-ГЕН. При использовании наборов реагентов в варианте исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» этапы ПЦР-амплификации ДНК и детекции ДНК совмещены.

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора/комплекта реагентов для выделения ДНК).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала человека, содержащего ДНК *Gardnerella vaginalis*, программное обеспечение ПЦР-детектора («ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке») или детектирующего амплификатора («ПЦР с детекцией в режиме реального времени») должно регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Gardnerella vaginalis*).

В образцах биологического материала, не содержащего ДНК *Gardnerella vaginalis*, программное обеспечение детектирующего амплификатора или ПЦР-детектора должно регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Gardnerella vaginalis*) и положительный результат амплификации внутреннего контроля.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *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/недоверенных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см. 2.3, 9.4, 9.5).

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

50 копий ДНК *Gardnerella vaginalis* 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
100	94	94	100
50	94	94	100
25	94	19	20,2
0	94	0	0,0

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

Пример :

Предел обнаружения 50 копий на амплификационную пробирку соответствует следующим значениям концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* при использовании наборов/комплектов для выделения нуклеиновых кислот производства ООО «НПО ДНК-Технология»:

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)	500 копий/образец	1000 копий/образец	3000 копий/образец	5000 копий/образец

3.4 Диагностические характеристики

Количество образцов (n) – 398;

Диагностическая чувствительность составляет (95% ДИ): 98,9% (97,2-99,6%);

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ): 97,0% (93,9-98,6%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением 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	-	-
ПЦР-буфер (фон)	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%	Является безопасным для конечного пользователя

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 исключен.

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	Real-time		Flash
	Фасовка S	Фасовка U	
ПЦР-бокс	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	нет
Детектор флуоресценции ДФ-520/560-«ДЖИН», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01274 или Детектор флуоресцентный «ДЖИН-4», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01249	нет	нет	да
Термостат программируемый ТП4-ПЦР-01-«Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ №ФСР 2007/01275	нет	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да ²	да	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл	да	да ³	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да ²	нет	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,5 мл	нет	нет	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл	да	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да
пробирки амплификационные объемом 0,2 мл с крышками	нет	да ³	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да
транспортная среда (при необходимости)	да	да	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)	да	да	да

¹ - далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже

² - только для фасовки S, стрипы

³ - только для ручного дозирования

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Real-time		Flash
	Фасовка S	Фасовка U	
Устройство дозирующее ДТстрим в варианте исполнения 12М1 или 15М1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982	нет	да ¹	нет
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *М1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	да ¹	нет
Устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология»	нет	да ¹	нет
центрифуга с RCF (g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	да ¹	нет
полимерная термопленка для запечатывания микропланшетов 384 лунки	нет	да ¹	нет
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да ¹	нет
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала ² : - Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС по ТУ 9398-035-46482062-2009 в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; - Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в форме комплектации: ПРОБА-ГС, ООО «НПО ДНК-Технология», 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 «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2008/02939			

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/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек;
- точность поддержания и однородность температуры не более ± 0,4 °С.

¹ - только для автоматизированного дозирования

² - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК *Gardnerella vaginalis* определяется видом биологического материала

Для работы с набором реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229;
- «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования);
- «ДТлайт» (модификация «ДТлайт *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228;
- Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 (только для набора реагентов в фасовке S, пробирки; в фасовке U для ручного дозирования);
- CFX96, Био-Рад Лабораториес, Инк; США, РУ № ФСЗ 2008/03399;
- Applied Biosystems QuantStudio 5, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.», Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446.

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 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 предварительная обработка образцов биологического материала (6.5).

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

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения, согласно установленной в зависимости от источника биологического материала процедуре.

ВНИМАНИЕ! Использование цитощёток для взятия соскобов из урогенитального тракта противопоказано при беременности.

Ограничение метода¹: местное применение лекарственных препаратов, использование лубрикантов, УЗИ вагинальным датчиком 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 «НПО ДНК-Технология»).

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.

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

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.

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

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 объемом до 60 мл, снабженный 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 рекомендуемых 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 18 °С до минус 22 °С 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.

6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия 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, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+). При использовании набора реагентов в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» промаркируйте дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

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 (вариант исполнения «Real-time») или не более чем на 10 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца, 1 положительного контрольного образца и 2 пробирок «ФОН» (вариант исполнения «Flash») в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого нужно:

- «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» (Real-time): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.
- «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» (Flash): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-», одну пробирку для «К+», две пробирки «ФОН». Общее количество пробирок – 8.

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

7.2.3 Добавьте в каждую пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы. Добавьте в пробирки, промаркированные «ФОН», по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).

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. Закройте пробирки/стрипы.

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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000-16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 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 с препаратом ДНК 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. Закрывайте 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-», «К+» и «ФОН», ДНК не вносится.

7.2.7 Внесите в пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

Примечание – Готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии набора реагентов при условии использования того же набора/комплекта реагентов для выделения ДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение одного месяца. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (от 18 °С до 25 °С), для этого за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

7.2.8 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 программируемый термостат/амплификатор или в детектирующий амплификатор.

7.2.11 Для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке»: Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, в режиме, приведённом в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для амплификаторов с активным регулированием (например, программируемый термостат Терцик). Время в скобках указано для амплификаторов без активного регулирования.

№ п.п.	Температура, °С	Время		Количество циклов
		мин	с	
1	94,0	1	00	1
2	94,0	0	05 (50)	5
	67,0	0	15 (50)	
3	94,0	0	01 (50)	30
	67,0	0	15 (50)	
4	10,0	...	...	Хранение

Примечание – Более подробное описание программирования и управления программируемым термостатом «Терцик» содержится в инструкции по эксплуатации прибора (см. «Руководство пользователя»).

7.2.12 Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени»:

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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

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

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 4, 5, 6 соответственно.

ВНИМАНИЕ!

1. Для детектирующих амплификаторов серии ДТ, CFX96, Applied Biosystems QuantStudio 5 возможно использование программ амплификации, общих для всех наборов реагентов производства ООО «НПО ДНК-Технология» и ООО «ДНК-Технология ТС», предназначенных для выявления ДНК микроорганизмов (Приложение В, таблицы В.1-В.3). В этом случае при анализе результатов необходимо обращать внимание на значение $C_p/C_q/C_t$ по каналу детекции Fam, положительный результат учитывается только для тех образцов, для которых значение $C_p/C_q/C_t$ по каналу детекции Fam ≤ 35 .

2. Для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q использование дополнительной программы амплификации не предусмотрено, интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 10.

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

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка S)

№ 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	35		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

Таблица 4 – 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 5 – 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	0:15	40
4	64 √	0:20	

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

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

Таблица 6 – 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	0:20	40
	2	64 ✓	0:20	
✓ - 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 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 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-вортке в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1-3 с.

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

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

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-вортке в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000-16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 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-вортке в течение 1-3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК 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-вортке в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортке 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. Закрывайте 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 количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.
- 7.3.15 Для детектирующих амплификаторов CFX96, Applied Biosystems QuantStudio 5 и Rotor-Gene Q:
Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 5, 6, 8 соответственно.

ВНИМАНИЕ!

1. Для детектирующих амплификаторов серии ДТ, CFX96, Applied Biosystems QuantStudio 5 возможно использование программ амплификации, общих для всех наборов реагентов производства ООО «НПО ДНК-Технология» и ООО «ДНК-Технология ТС», предназначенных для выявления ДНК микроорганизмов (Приложение В, таблицы В.2-В.4). В этом случае при анализе результатов необходимо обращать внимание на значение $C_p/C_q/C_t$ по каналу детекции Fam, положительный результат учитывается только для тех образцов, для которых значение $C_p/C_q/C_t$ по каналу детекции Fam ≤ 35 .
2. Для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q использование дополнительной программы амплификации не предусмотрено, интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 10.

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

Таблица 7 – 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	35		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

Таблица 8 – 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

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

ВНИМАНИЕ!

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

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

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-вортке в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1-3 с.

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

7.4.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000-16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 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-вортке в течение 1-3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК 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-вортке в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортке 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, отрицательными контрольными

образцами и положительными контрольными образцами, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

- 7.4.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.4.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термопленкой согласно инструкции к прибору 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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

ВНИМАНИЕ! Возможно использование программы амплификации, общей для всех наборов реагентов производства ООО «НПО ДНК-Технология» и ООО «ДНК-Технология ТС», предназначенных для выявления ДНК микроорганизмов (Приложение В, таблица В.4). В этом случае при анализе результатов необходимо обращать внимание на значение C_p по каналу детекции Fam, положительный результат учитывается только для тех образцов, для которых значение C_p по каналу детекции Fam ≤ 35 .

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

- 8.1** Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора
После прохождения реакции амплификации поместите пробирки в ПЦР-детектор, оформите протокол и проведите регистрацию результатов в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50).
- 8.2** Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов
Регистрация сигнала флуоресценции на детектирующих амплификаторах серии ДТ, Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5 проводится 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 ПЦР-детектором или 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 9 (для флуоресцентных детекторов серии ДЖИН и детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт», CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5) и таблицей 10 (для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q). Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Т а б л и ц а 9 – Интерпретация результатов ПЦР для флуоресцентных детекторов серии ДЖИН и детектирующих амплификаторов серии ДТ, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5

Flash	Real-time		Интерпретация результата ¹
Результат, полученный на флуоресцентном детекторе «ДЖИН» или «ДЖИН-4»	Канал детекции Fam (искомая ДНК), Cp/Cq/Ct	Канал детекции Hex/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы			
«+»	Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i> («+»)
«-»	Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i> («-»)
«нд»	Не указан	Не указан	Недостоверный результат («нд»)
Отрицательный контрольный образец			
«-»	Не указан	Указан	Отрицательный результат («-») Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец			
«+»	Указан	Не учитывается	Положительный результат («+») Результаты постановки валидны

¹ - при использовании программ амплификации, общих для всех наборов реагентов производства ООО «НПО ДНК-Технология» и ООО «ДНК-Технология ТС», предназначенных для выявления ДНК микроорганизмов (программы амплификации для фасовок S, U приведены в Приложении В), положительный результат учитывается только для тех образцов, для которых значение Cp/Cq/Ct по каналу детекции Fam ≤ 35.

Таблица 10 – Интерпретация результатов ПЦР для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

Канал детекции Green (искомая ДНК), Ct	Канал детекции Yellow (внутренний контроль), Ct	Интерпретация результата
Неизвестные образцы		
≤ 30	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i>
Не указан или > 30	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i>
Не указан	Не указан	Недостоверный результат
Отрицательный контрольный образец		
Не указан	Указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец		
≤ 30	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 необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение ДНК и постановку ПЦР для этого образца, либо 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 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq MAX (фасовка U), 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 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U) в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.3 Смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.4 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 Для получения 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 (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °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.

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 приемка 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 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 52905-2007 (ИСО 15190:2003) 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

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

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

№ 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	35		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Gardnerella vaginalis</i>	ВК	-	-	-

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов ГАРД-ГЕН
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	35		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Gardnerella vaginalis</i>	BK	-	-	-

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

**Программы амплификации, допустимые при использовании набора реагентов
ГАРД-ГЕН в фасовках S, U**

ВНИМАНИЕ! При использовании данных программ положительный результат учитывается только для тех образцов, для которых значение Cp/Cq/Ct по каналу детекции Fam ≤ 35.

Таблица В.1 – 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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

Таблица В.2 – 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	0:15	50
4	64 √	0:20	
√ - режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex) при 64 °C			

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

Таблица В.3 – 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	0:20	50
	2	64 ✓	0:20	

✓ - сбор данных для необходимых флуорофоров (Fam, Vic (Hex)) включен

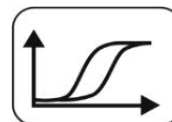
Таблица В.4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка U)

№ 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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение

✓ - режим оптических измерений

Номер 443-4
2024-06-28

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C



439-5 2025-03-12



ИНСТРУКЦИЯ

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

ПЛАЗМОГЕН-Мх

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/02551 от 11 марта 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.....	15
6.1 Материал для исследования	15
6.2 Общие требования	15
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	23
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
БВ	- бактериальный вагиноз
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 hominis была выделена из половых путей человека в 1937 году. *Mycoplasma hominis* вызывает воспаление слизистых оболочек половых органов человека, является возбудителем урогенитального микоплазмоза.

Осложнениями микоплазмозов могут быть циститы и пиелонефриты. Хронический микоплазмоз может быть причиной бесплодия и преждевременных родов.

Mycoplasma hominis совместно с *Gardnerella vaginalis*, наиболее изученным вагинальным анаэробом, наряду с другими анаэробными бактериями участвуют в развитии бактериального вагиноза (БВ) у женщин, хотя не являются единственной его причиной. Данная группа БВ-ассоциированных бактерий может также вызывать воспалительные заболевания нижних отделов мочеполовых путей у мужчин.

Применение набора реагентов для выявления ДНК микоплазмы хоминис (*Mycoplasma hominis*) 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. Taylor-Robinson D1. Mollicutes in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium*. Res Microbiol. 2017 Mar 2. pii: S0923-2508(17)30044-X.
2. Cox C, Watt AP, McKenna JP, Coyle PV. *Mycoplasma hominis* and *Gardnerella vaginalis* display a significant synergistic relationship in bacterial vaginosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016 Mar; 35(3):481-7.
3. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Matsen FA, Fiedler TL, Hall RW, et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. PLoS One. 2012; 7(6).
4. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas K, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 2007; 45:3270–3276.
5. Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, Ferris MJ. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 2010; 48:1812–1819.
6. Horner P.J., Blee K., Falk L., Meijden W. Moi H. 2016 European guideline on the management of non-gonococcal urethritis. Int J STD AIDS, 2016 Oct; 27(11):928-37.
7. Hillier S L, Kiviat N B, Hawes S E. et al. Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis. Am J Obstet Gynecol. 1996; 175:435–441.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2010. Diseases characterized by vaginal discharge. <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/toc.htm>. Accessed February 28, 2011.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

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

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК микоплазмы хоминис (*Mycoplasma hominis*) 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 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

REF R1-P102-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-P102-23/9, 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-P102-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 Nhe. 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 hominis</i>	BK	–	–	–

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

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

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Mycoplasma hominis*, детектирующий амплификатор должен регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Mycoplasma hominis*) 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*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma genitalium*, *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 (см. 2.3, 9.3, 9.4).

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 hominis* 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	85	90,4
0	94	0	0,0

Примечание – Предел обнаружения ДНК *Mycoplasma hominis* 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 hominis* 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 ¹ (при элюции в 300 мкл)	ПРОБА- РАПИД
- Соскоб эпителиальных клеток в 500 мкл транспортной среды²; - 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): 97,5% (92,5–99,5%);

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ): 99,1% (97,8–99,6%).

¹ – только для соскобов эпителиальных клеток

² – в качестве транспортной среды использовалась Транспортная среда для биопроб STOP-Ф, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640

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 клинко-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 12М1 или 15М1, 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 *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 ПЦР	нет	нет	нет	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	нет	нет	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)				

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы ¹	пробирки	ручное	автоматизированное
транспортная среда (при необходимости), рекомендуются: – Транспортная среда для биопроб СТФ-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640; – Транспортная среда для биопроб с муколитиком (СТФ-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 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 hominis</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 объемом 1,5 мл, в которые предварительно внесено 300–500 мкл стерильного физиологического раствора;
- в пробирки с транспортной средой, предназначенной производителем

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

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:

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 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 рекомендуемых 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/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-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 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 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 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 ²	...	...	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

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

² – допускается хранение при температуре 10 °C

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

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 hominis</i>
Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Mycoplasma hominis</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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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-Мх
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 hominis</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-Мх
в фасовке U**

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

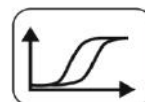
№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	25 ¹	...	...	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

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

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C



442-5 2024-06-28



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК трихомонасы вагиналис (*Trichomonas vaginalis*)
методом полимеразной цепной реакции

ТРИХО-ГЕН

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03848 от 25 июня 2024 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	6
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	7
2.1 Состав набора реагентов.....	7
2.2 Количество анализируемых образцов.....	8
2.3 Принцип метода	9
2.4 Время проведения анализа	10
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	11
3.1 Аналитическая специфичность	11
3.2 Интерферирующие вещества	11
3.3 Предел обнаружения	12
3.4 Диагностические характеристики.....	12
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	13
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	15
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	18
6.1 Материал для исследования	18
6.2 Общие требования	18
6.3 Взятие материала на исследование.....	18
6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала.....	21
6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК	21
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	22
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	22
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	22
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	26
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора ДТпрайм)...	30
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	31
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	32
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	33
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	34
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	34
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	34
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	35
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	36
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	37
Приложение А.....	38
Приложение Б.....	39

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

RCF	- 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

Трихомониаз – наиболее распространенная во всем мире излечимая инфекция из числа инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), вызываемая паразитарным простейшим, *Trichomonas vaginalis*.

Клинически инфекция *Trichomonas vaginalis* протекает в виде вульвовагинита, цервицита и реже – уретрита. Осложнениями инфекции *Trichomonas vaginalis* могут быть эндометрит и воспалительные заболевания органов малого таза, осложнениями при беременности и родах могут быть преждевременный разрыв мембран, преждевременные роды и низкий вес плода при рождении.

У мужчин клинически инфекция *Trichomonas vaginalis* протекает в виде уретральных выделений, баланита и баланопостита. Осложнениями инфекции у мужчин могут быть простатит и эпидидимит. Было показано, что трихомониаз повышает восприимчивость к ВИЧ-инфекции в два раза.

Хотя микроскопические и культуральные методы исследования остаются наиболее широко используемыми диагностическими тестами для трихомониаза, методы анализа нуклеиновых кислот (МАНК), к которым относится метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), являются наиболее чувствительными для диагностики этой инфекции.

Применение набора реагентов для выявления ДНК трихомонас вагиналис (*Trichomonas vaginalis*) позволяет своевременно выявить возбудителя и назначить лечение, в том числе и с использованием специфических препаратов. Изделие может использоваться для контроля успешности лечения путем повторных исследований. Отрицательный результат исследования позволяет исключить трихомониаз при проведении дифференциальной диагностики заболеваний.

Список литературы

1. Domeika M, Zhurauskaya L, Savicheva A. et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of trichomoniasis in East European countries. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2010 Oct; 24(10):1125-34.
2. Schmid G, World Health Organization (WHO). Global Estimates of the Incidence and Prevalence of Sexually Transmitted Infections (STIs). 18th International Society for Sexually Transmitted Disease Research conference (ISSTD), London, UK, 28 June to 1 July 2009, 2005.
3. Laga M, Nzila N, Goeman J. The interrelationship of sexually transmitted diseases and HIV infection: implications for the control of both epidemics in Africa. AIDS 1991; 5(Suppl.): S55-S63.
4. Laga M, Manoka A, Kivuvu M et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-I transmission in women: results from a cohort study. AIDS 1993; 7: 95-102.
5. Honigberg BM ed. Trichomonads Parasitic in Humans. Springer-Verlag, New York, 1990.
6. Krieger JN. Trichomoniasis in men: old issues and new data. Sex Transm Dis 1995; 22: 83-96.
7. Sen~a AC, Miller WC, Hobbs MM et al. Trichomonas vaginalis infection in male sexual partners: implications for diagnosis, treatment, and prevention. Clin Infect Dis 2007; 44: 13-22.
8. Crucitti T, Van Dyck E, Tehe A et al. Comparison of culture and different PCR assays for detection of Trichomonas vaginalis in self collected vaginal swab specimens. Sex Transm Infect 2003; 79: 393-398.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК трихомонаса вагиналис (*Trichomonas vaginalis*) методом полимеразной цепной реакции (ТРИХО-ГЕН), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК трихомонаса вагиналис (*Trichomonas vaginalis*) 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 мочеполового тракта, контроль лечения трихомониаза.

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.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов ТРИХО-ГЕН выпускается в следующих вариантах исполнения:

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

Варианты исполнения различаются способом детекции амплифицированной ДНК *Trichomonas vaginalis*:

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

2.1 Состав набора реагентов

2.1.1 ПЦР с детекцией в режиме реального времени

REF R1-P107-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	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-P107-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	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

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

REF R1-P107-UA/9, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТaq 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

2.1.2 ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке

REF F1-P107-51/1, фасовка S, пробирки 0,5 mL			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	100 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
ПЦР-буфер (фон)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец 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.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 96 определений для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» и 100 определений для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке», включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов, положительных контрольных образцов и фоновых пробирок. Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» предусмотрено не более 24 постановок, для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» - не более 10 постановок.

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

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, с флуоресцентной детекцией по конечной точке; 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°C. Это исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт 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 или ПЦР-детектором.

Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в варианте исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» или после проведения амплификации в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке».

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 Nhe. 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>Trichomonas vaginalis</i>	ВК	-	-	-

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК *Trichomonas vaginalis* и детекция продуктов амплификации с использованием набора реагентов ТРИХО-ГЕН. При использовании наборов реагентов в варианте исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» этапы ПЦР-амплификации ДНК и детекции ДНК совмещены.

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора/комплекта для выделения ДНК).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

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

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Trichomonas vaginalis*, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должен регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Trichomonas vaginalis*) и положительный результат амплификации внутреннего контроля.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *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 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 *Trichomonas vaginalis* 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	73	77,6
0	94	0	0,0

Примечание – Предел обнаружения ДНК *Trichomonas vaginalis* 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 *Trichomonas vaginalis* при использовании комплектов для выделения нуклеиновых кислот производства ООО «НПО ДНК-Технология»:

Образец	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) – 100,0% (76,8-100,0%);

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ) – 99,7% (99,0-99,7%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением 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	-	-
ПЦР-буфер (фон)	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%	Является безопасным для конечного пользователя

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 исключен.

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	Real-time		Flash
	Фасовка S	Фасовка U	
ПЦР-бокс	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	нет
Детектор флуоресценции ДФ-520/560-«ДЖИН», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01274 или Детектор флуоресцентный «ДЖИН-4», ОО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01249	нет	нет	да
Термостат программируемый ТП4-ПЦР-01-«Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ №ФСР 2007/01275	нет	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да ²	да	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл	да ³	да ⁴	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да ²	нет	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,5 мл	нет	нет	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл	да	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да
пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл с крышками	нет	да ⁴	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да
транспортная среда (при необходимости)	да	да	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)	да	да	да

¹ - далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже

² - только для фасовки S, стрипы

³ - только для фасовки S, пробирки

⁴ - только для ручного дозирования

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Real-time		Flash
	Фасовка S	Фасовка U	
Устройство дозирующее ДТстрим в варианте исполнения 12M1 или 15M1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982	нет	да ¹	нет
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *M1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	да ¹	нет
устройство для запечатывания планшет ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология»	нет	да ¹	нет
центрифуга с RCF (g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	да ¹	нет
полимерная термопленка для запечатывания микропланшетов 384 лунки	нет	да ¹	нет
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да ¹	нет
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала ² : - Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС по ТУ 9398-035-46482062-2009 в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; - Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в форме комплектации: ПРОБА-ГС, ООО «НПО ДНК-Технология», 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 «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2008/02939			

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/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек;
- точность поддержания и однородность температуры не более $\pm 0,4$ °С.

¹ - только для автоматизированного дозирования

² - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК *Trichomonas vaginalis* определяется видом биологического материала

В ходе клинических испытаний валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229;
- «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования);
- «ДТлайт» (модификация «ДТлайт *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228;
- Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 (только для набора реагентов в фасовке S, пробирки; в фасовке U для ручного дозирования при использовании пробирок);
- CFX96, Био-Рад Лабораториз, Инк; США, РУ № ФСЗ 2008/03399;
- Applied Biosystems QuantStudio 5, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.», Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446.

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 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 предварительная обработка образцов биологического материала (6.5).

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

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий (в зависимости от источника биологического материала), имеющих регистрационные удостоверения, согласно установленной процедуре.

ВНИМАНИЕ! Использование цитощёток для взятия соскобов из урогенитального тракта противопоказано при беременности.

Ограничение метода¹: местное применение лекарственных препаратов, УЗИ вагинальным датчиком 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;
- 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 «НПО ДНК-Технология»).

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.

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

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.

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

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 закрывающейся 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 объемом до 60 мл, снабженный 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 рекомендуемых наборов/комплектов реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-РАПИД) 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 18 °С до минус 22 °С 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.

6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия 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, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+). При использовании набора реагентов в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» промаркируйте дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

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 (вариант исполнения «Real-time») или не более чем на 10 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца, 1 положительного контрольного образца и 2 пробирок «ФОН» (вариант исполнения «Flash») в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого нужно:

- «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» (Real-time): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.
- «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» (Flash): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-», одну пробирку для «К+», две пробирки «ФОН». Общее количество пробирок – 8.

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 в каждую пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. Добавьте в пробирки, промаркированные «ФОН», по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).

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. Закройте пробирки/стрипы.

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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 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 с препаратом ДНК 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. Закрывайте 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-», «К+» и «ФОН», ДНК не вносится.

7.2.7 Внесите в пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

Примечание - Готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии набора реагентов при условии использования того же набора/комплекта реагентов для выделения ДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение одного месяца. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (от 18 °С до 25 °С), для этого за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

7.2.8 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 программируемый термостат/амплификатор или в детектирующий амплификатор.

7.2.11 Для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке»: Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, в режиме, приведённом в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для амплификаторов с активным регулированием (например, программируемый термостат Терцик). Время в скобках указано для амплификаторов без активного регулирования.

№ п.п.	Температура, °С	Время		Количество циклов
		мин	с	
1	94,0	1	00	1
2	94,0	0	05 (50)	5
	64,0	0	05 (50)	
	67,0	0	05 (50)	
3	94,0	0	01 (50)	40
	64,0	0	05 (50)	
	67,0	0	05 (50)	
4	10,0	...	...	Хранение

Примечание - Более подробное описание программирования и управления программируемым термостатом «Терцик» содержится в инструкции по эксплуатации прибора (см. «Руководство пользователя»).

7.2.12 Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени»:

Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение 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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

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

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 4, 5, 6 соответственно.

Таблица 3 – 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	10 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 25 °C

Таблица 4 – 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 5 – 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	0:15	50
4	64 ✓	0:20	

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

Таблица 6 – 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	0:20	50
	2	64 ✓	0:20	

✓ - 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 «К-» и 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 ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq 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 в пробирки со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ. 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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 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 с препаратом ДНК 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. Закрывайте 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 количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

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

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

Проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 18 мкл, по программам амплификации, приведенным в таблицах 5, 6, 8 соответственно.

Таблица 7 – 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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

Таблица 8 – 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 25 °C

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора ДТпрайм)

ВНИМАНИЕ! 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 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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 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 с препаратом ДНК 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, отрицательными контрольными образцами и положительными контрольными образцами, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.
- 7.4.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.4.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термопленкой согласно инструкции к прибору 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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора

После прохождения реакции амплификации поместите пробирки в ПЦР-детектор, оформите протокол и проведите регистрацию результатов в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

8.2 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов

Регистрация сигнала флуоресценции на детектирующих амплификаторах серии ДТ, Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5 проводится 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 ПЦР-детектором или 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 9. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Т а б л и ц а 9 – Интерпретация результатов ПЦР

Flash	Real-time		Интерпретация результата
Результат, полученный на флуоресцентном детекторе «ДЖИН» или «ДЖИН-4»	Канал детекции Fam/Green (искомая ДНК), Cp/Cq/Ct	Канал детекции Hex/Yellow/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы			
«+»	Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i> («+»)
«-»	Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i> («-»)
«нд»	Не указан	Не указан	Недостовверный результат («нд»)
Отрицательный контрольный образец			
«-»	Не указан	Указан	Отрицательный результат («-») Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец			
«+»	Указан	Не учитывается	Положительный результат («+») Результаты постановки валидны

9.4 Недостовверный 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 необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение ДНК и постановку ПЦР для этого образца, либо 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 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.
- 10.1.3 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U) в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.
- 10.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

- 10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.
- 10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.2.3 Смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.2.4 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
- 10.3.2 Для получения 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 (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °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.

10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 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>
	Предел температуры
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> тестов
	Использовать до
	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению
	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 приемка 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 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. 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

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов ТРИХО-ГЕН
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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy 5	Cy 5.5
<i>Trichomonas vaginalis</i>	BK	-	-	-

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

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

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объём 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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy 5	Cy 5.5
<i>Trichomonas vaginalis</i>	BK	-	-	-

Номер 442-5

2024-06-28

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C



444-5 2024-06-28



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК нейссерии гонореи (*Neisseria gonorrhoeae*)
методом полимеразной цепной реакции

ГОНО-ГЕН

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03850 от 25 июня 2024 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	8
2.4 Время проведения анализа	9
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
3.1 Аналитическая специфичность	9
3.2 Интерферирующие вещества	9
3.3 Предел обнаружения	10
3.4 Диагностические характеристики.....	10
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	11
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	13
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	16
6.1 Материал для исследования	16
6.2 Общие требования	16
6.3 Взятие материала на исследование.....	16
6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала.....	19
6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК	19
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	20
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	20
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	20
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	24
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора ДТпрайм)...	28
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	30
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	30
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	31
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	32
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	32
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	32
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	33
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	34
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	35
Приложение А.....	37
Приложение Б.....	38

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

RCF	- 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
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК)
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНКазы	- рибонуклеазы

ВВЕДЕНИЕ

Гонорея, вызванная *Neisseria gonorrhoeae*, является второй по распространенности (после хламидиоза) бактериальной инфекцией, передаваемой половым путем (ИППП) и приводит к значительной заболеваемости и экономическим издержкам во всем мире. По сообщению экспертной группы ВОЗ в 2012 году во всем мире было выявлено 357 миллионов новых случаев излечимых ИППП среди взрослых в возрасте 15-49 лет, из них 78 миллионов случаев гонореи [1,2]. Неосложненная гонококковая инфекция у мужчин чаще всего протекает в виде уретрита, а у женщин – в виде мукопулентного цервицита. Гонококковые инфекции у женщин часто протекают бессимптомно, что не позволяет своевременно их диагностировать. Ректальные и глоточные инфекции у мужчин и женщин также в основном бессимптомны [1].

Отсутствие клинических симптомов гонококковой инфекции и, как следствие, несвоевременная диагностика и лечение могут привести к таким серьезным осложнениям, как воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), внематочную беременность и бесплодие у женщин. У мужчин осложнениями уретральной гонококковой инфекции могут быть эпидидимит, стриктура уретры и бесплодие [1].

Неязвенные ИППП, такие как гонорея, хламидиоз и трихомониаз, увеличивают вероятность заражения ВИЧ половым путем [3]. Адекватное и своевременное лечение ИППП необходимо для сокращения передачи ВИЧ и улучшения сексуального и репродуктивного здоровья [4].

Применение набора реагентов для выявления ДНК нейссерии гонореи (*Neisseria gonorrhoeae*) позволяет своевременно выявить возбудителя и назначить лечение, в том числе и с использованием специфических препаратов. Изделие может использоваться для контроля успешности лечения путем повторных исследований. Отрицательный результат исследования позволяет исключить гонорею при проведении дифференциальной диагностики заболеваний.

Список литературы

1. WHO Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: World Health Organization; 2016. ISBN-13: 978-92-4-154969-1.
2. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N et al. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. PLoS One. 2015; 10(12): e0143304. doi:10.1371/journal.pone.0143304.
3. Johnson LF, Lewis DA. The effect of genital tract infections on HIV-1 shedding in the genital tract: a systematic review and meta-analysis. Sex Transm Dis. 2008; 35(11):946–59. doi:10.1097/OLQ.0b013e3181812d15.
4. Cohen MS. Classical sexually transmitted diseases drive the spread of HIV-1: back to the future. J Infect Dis. 2012; 206(1):1–2. doi:10.1093/infdis/jis303.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК нейссерии гонореи (*Neisseria gonorrhoeae*) методом полимеразной цепной реакции (ГОНО-ГЕН), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК нейссерии гонореи (*Neisseria gonorrhoeae*) 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 гонококковой инфекции (гонореи).

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.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов ГОНО-ГЕН выпускается в следующих вариантах исполнения:

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

Варианты исполнения различаются способом детекции амплифицированной ДНК *Neisseria gonorrhoeae*:

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

2.1 Состав набора реагентов

2.1.1 ПЦР с детекцией в режиме реального времени

REF R1-P109-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	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-P109-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	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

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

REF R1-P109-UA/9, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТaq 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

2.1.2 ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке

REF F1-P109-51/1, фасовка S, пробирки 0,5 mL			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	100 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
ПЦР-буфер (фон)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец 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.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 96 определений для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» и 100 определений для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке», включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов, положительных контрольных образцов и фоновых пробирок. Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» предусмотрено не более 24 постановок, для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» – не более 10 постановок.

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

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, с флуоресцентной детекцией по конечной точке; 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 несёт 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 или ПЦР-детектором.

Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в варианте исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» или после проведения амплификации в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке».

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 Нех. 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>Neisseria gonorrhoeae</i>	ВК	-	-	-

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК *Neisseria gonorrhoeae* и детекция продуктов амплификации с использованием набора реагентов ГОНО-ГЕН. При использовании наборов реагентов в варианте исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» этапы ПЦР-амплификации ДНК и детекции ДНК совмещены.

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора/комплекта для выделения ДНК).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

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

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должен регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Neisseria gonorrhoeae*) и положительный результат амплификации внутреннего контроля.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *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 (см. 2.3, 9.3, 9.4).

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 *Neisseria gonorrhoeae* 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	83	88,3
0	94	0	0

Примечание – Предел обнаружения ДНК *Neisseria gonorrhoeae* 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 *Neisseria gonorrhoeae* при использовании комплектов для выделения нуклеиновых кислот производства ООО «НПО ДНК-Технология»:

Образец	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) – 100,0% (88,2-100,0%);

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ) – 99,7% (98,9-99,7%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением 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 клинко-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	-	-
ПЦР-буфер (фон)	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%	Является безопасным для конечного пользователя

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 исключен.

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	Real-time		Flash
	Фасовка S	Фасовка U	
ПЦР-бокс	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	нет
Детектор флуоресценции ДФ-520/560-«ДЖИН», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01274 или Детектор флуоресцентный «ДЖИН-4», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01249	нет	нет	да
Термостат программируемый ТП4-ПЦР-01-«Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ №ФСР 2007/01275	нет	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да ²	да	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл	да ³	да ⁴	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да ²	нет	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,5 мл	нет	нет	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл	да	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да
пробирки амплификационные объемом 0,2 мл с крышками	нет	да ⁴	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да
транспортная среда (при необходимости)	да	да	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)	да	да	да

¹ - далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже

² - только для фасовки S, стрипы

³ - только для фасовки S, пробирки

⁴ - только для ручного дозирования

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Real-time		Flash
	Фасовка S	Фасовка U	
Устройство дозирующее ДТстрим в варианте исполнения 12M1 или 15M1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982	нет	да ¹	нет
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *M1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	да ¹	нет
устройство для запечатывания планшет ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология»	нет	да ¹	нет
центрифуга с RCF (g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	да ¹	нет
полимерная термопленка для запечатывания микропланшетов 384 лунки	нет	да ¹	нет
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да ¹	нет
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала ² : - Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС по ТУ 9398-035-46482062-2009 в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; - Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в форме комплектации: ПРОБА-ГС, ООО «НПО ДНК-Технология», 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 «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2008/02939			

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/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек;
- точность поддержания и однородность температуры не более $\pm 0,4$ °С.

¹ - только для автоматизированного дозирования

² - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК *Neisseria gonorrhoeae* определяется видом биологического материала

В ходе клинических испытаний с набором реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229;
- «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования);
- «ДТлайт» (модификация «ДТлайт *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228;
- Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 (только для набора реагентов в фасовке S, пробирки; в фасовке U для ручного дозирования при использовании пробирок);
- CFX96, Био-Рад Лабораториес, Инк; США, РУ № ФСЗ 2008/03399;
- Applied Biosystems QuantStudio 5, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.», Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446.

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 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 предварительная обработка образцов биологического материала (6.5).

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

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий (в зависимости от источника биологического материала), имеющих регистрационные удостоверения, согласно установленной процедуре.

ВНИМАНИЕ! Использование цитощёток для взятия соскобов из урогенитального тракта противопоказано при беременности.

Ограничение метода¹: местное применение лекарственных препаратов, УЗИ вагинальным датчиком 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;
- 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 «НПО ДНК-Технология»).

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.

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

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.

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

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 рекомендуемых наборов/комплектов реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-РАПИД) 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 18 °С до минус 22 °С 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.

6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия 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, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+). При использовании набора реагентов в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» промаркируйте дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

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 (вариант исполнения «Real-time») или не более чем на 10 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца, 1 положительного контрольного образца и 2 пробирок «ФОН» (вариант исполнения «Flash») в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого нужно:

- «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» (Real-time): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.
- «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» (Flash): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-», одну пробирку для «К+», две пробирки «ФОН». Общее количество пробирок – 8.

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 в каждую пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. Добавьте в пробирки, промаркированные «ФОН», по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).

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. Закройте пробирки/стрипы.

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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 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 с препаратом ДНК 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. Закрывайте 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-», «К+» и «ФОН», ДНК не вносится.

7.2.7 Внесите в пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

Примечание – Готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии набора реагентов при условии использования того же набора/комплекта реагентов для выделения ДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение одного месяца. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (от 18 °С до 25 °С), для этого за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

7.2.8 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 программируемый термостат/амплификатор или в детектирующий амплификатор.

7.2.11 Для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке»: Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, в режиме, приведённом в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для амплификаторов с активным регулированием (например, программируемый термостат Терцик). Время в скобках указано для амплификаторов без активного регулирования.

№ п.п.	Температура, °С	Время		Количество циклов
		мин	с	
1	94,0	1	00	1
2	94,0	0	05 (50)	5
	64,0	0	05 (50)	
	67,0	0	05 (50)	
3	94,0	0	01 (50)	40
	64,0	0	05 (50)	
	67,0	0	05 (50)	
4	10,0	...	...	Хранение

Примечание – Более подробное описание программирования и управления программируемым термостатом «Терцик» содержится в инструкции по эксплуатации прибора (см. «Руководство пользователя»).

7.2.12 Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени»:

Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:
Запустите программное обеспечение 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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.
Для детектирующих амплификаторов Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:
Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 4, 5, 6 соответственно.

Таблица 3 – 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	10 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 25 °C

Таблица 4 – 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 5 – 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	0:15	50
4	64 ✓	0:20	

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

Таблица 6 – 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	0:20	50
	2	64 ✓	0:20	

✓ - 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 «К-» и 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 ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq 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 в пробирки со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ. 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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 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 с препаратом ДНК 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. Закрывайте 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 количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

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

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 5, 6, 8 соответственно.

Таблица 7 – 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	10 ²	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

¹ - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении Б) или предоставляется производителем набора реагентов
² - допускается хранение при температуре 25 °C

Таблица 8 – 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

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим (только для детектирующего амплификатора ДТпрайм)

ВНИМАНИЕ! 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 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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 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 с препаратом ДНК 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 ТехноTaq MAX, с препаратами ДНК, отрицательными контрольными образцами и положительными контрольными образцами, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.
- 7.4.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.4.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термопленкой согласно инструкции к прибору 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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора

После прохождения реакции амплификации поместите пробирки в ПЦР-детектор, оформите протокол и проведите регистрацию результатов в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

8.2 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов

Регистрация сигнала флуоресценции на детектирующих амплификаторах серии ДТ, Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5 проводится автоматически во время амплификации.

9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 Учёт результатов амплификации осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или 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 9. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 9 – Интерпретация результатов ПЦР

Flash	Real-time		Интерпретация результата
Результат, полученный на флуоресцентном детекторе «ДЖИН» или «ДЖИН-4»	Канал детекции Fam/Green (искомая ДНК), Cp/Cq/Ct	Канал детекции Hex/Yellow/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы			
«+»	Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i> («+»)
«-»	Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i> («-»)
«нд»	Не указан	Не указан	Недостоверный результат («нд»)
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 необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение ДНК и постановку ПЦР для этого образца, либо 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 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U) в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.

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

10.2 Хранение

10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

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

10.2.4 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 Для получения 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 (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °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.

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>
	Предел температуры
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> тестов
	Использовать до
	Код партии (серии)
	Дата изготовления
	Обратитесь к инструкции по применению
	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 приемка 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 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. 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

**Параметры теста, которые необходимо внести в программное обеспечение
детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»
при использовании набора реагентов ГОНО-ГЕН
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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy 5	Cy 5.5
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BK	-	-	-

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

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

- 1) Количество пробирок в тесте – 1;
- 2) Объём 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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy 5	Cy 5.5
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BK	-	-	-

¹ - допускается хранение при температуре 25 °C

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК
кандиды альбиканс (*Candida albicans*)
методом полимеразной цепной реакции

КАНД-ГЕН

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03847 от 25 июня 2024 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	8
2.4 Время проведения анализа	9
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
3.1 Аналитическая специфичность	9
3.2 Интерферирующие вещества	9
3.3 Предел обнаружения	10
3.4 Диагностические характеристики.....	10
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	11
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	13
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	15
6.1 Материал для исследования	15
6.2 Общие требования	15
6.3 Взятие материала на исследование.....	16
6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала.....	19
6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК	19
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	19
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	19
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	20
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	24
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	27
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	29
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	30
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	31
10.1 Транспортирование	31
10.2 Хранение.....	31
10.3 Указания по эксплуатации.....	31
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	32
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	32
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	32
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	33
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	34
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	35
Приложение А.....	36
Приложение Б.....	37

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	- рибонуклеазы

ВВЕДЕНИЕ

Кандида альбиканс (*Candida albicans*) является условно-патогенным микроорганизмом, способна вызывать такие заболевания, как кандидоз половых органов (молочницу), вагиноз, кандидоз кишечника, кандидоз слизистых, связанные со значительным ухудшением качества жизни. Также возможен кандидоз новорожденных, заражение при котором происходит во время родов. Патогенез во многом связан с состоянием макроорганизма, в том числе с иммунным статусом, применением антибиотиков широкого спектра действия и т.д. Применение набора реагентов для выявления ДНК кандиды альбиканс (*Candida albicans*) 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 кандидоз при проведении дифференциальной диагностики заболеваний.

Список литературы

1. Ю.К. Скрипкин. Кожные и венерические болезни. Учебник для врачей и студентов мед. вузов. — Москва: "Триада-X", 2000. — С. 204-205.
2. Achkar JM, Fries BC. Candida infections of the genitourinary tract. Clin Micro Reviews. 2010 Apr; 23(2): 253-273.
3. Anaisse E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A. Clinical Mycology. Churchill Livingstone, London, UK; 2003: 608 pp.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК кандиды альбиканс (*Candida albicans*) методом полимеразной цепной реакции (КАНД-ГЕН), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК кандиды альбиканс (*Candida albicans*) методом ПЦР в биологическом материале человека: соскобы эпителиальных клеток (из урогенитального тракта, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаза), моча, секрет простаты, эякулят.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению исследования: симптомы инфекционного или воспалительного заболевания мочеполового тракта, кишечника, ротоглотки, глаз, контроль лечения кандидоза.

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

Набор реагентов КАНД-ГЕН выпускается в следующих вариантах исполнения:

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

Варианты исполнения различаются способом детекции амплифицированной ДНК *Candida albicans*:

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

2.1 Состав набора реагентов

2.1.1 ПЦР с детекцией в режиме реального времени

REF R1-P110-S3/9, фасовка S, стрипы			
Наименование компонентов	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-P110-23/9, фасовка S, пробирки			
Наименование компонентов	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

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

REF R1-P110-UA/9, фасовка U			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость	1 пробирка	600 мкл
Полимераза ТехноТaq 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

2.1.2 ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке

REF F1-P110-51/1, фасовка S, пробирки 0,5 mL			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	100 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
ПЦР-буфер (фон)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец 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.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на проведение 96 определений для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» и 100 определений для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке», включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов, положительных контрольных образцов и фоновых пробирок. Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» предусмотрено не более 24 постановок, для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» – не более 10 постановок.

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

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, с флуоресцентной детекцией по конечной точке; 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 несёт 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 или ПЦР-детектором.

Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в варианте исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» или после проведения амплификации в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке».

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 Nhe. 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>Candida albicans</i>	ВК	–	–	–

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК *Candida albicans* и детекция продуктов амплификации с использованием набора реагентов КАНД-ГЕН. При использовании наборов реагентов в варианте исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» этапы ПЦР-амплификации ДНК и детекции ДНК совмещены.

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора/комплекта реагентов для выделения ДНК).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала человека, содержащего ДНК *Candida albicans*, программное обеспечение ПЦР-детектора («ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке») или детектирующего амплификатора («ПЦР с детекцией в режиме реального времени») должно регистрировать положительный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Candida albicans*).

В образцах биологического материала, не содержащего ДНК *Candida albicans*, программное обеспечение детектирующего амплификатора или ПЦР-детектора должно регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома *Candida albicans*) и положительный результат амплификации внутреннего контроля.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *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/недостовверных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см. 2.3, 9.4, 9.5).

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 *Candida albicans* 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	42	44,6
0	94	0	0,0

Примечание – Предел обнаружения ДНК *Candida albicans* 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 *Candida albicans* при использовании наборов/комплектов для выделения нуклеиновых кислот производства ООО «НПО ДНК-Технология»:

Образец	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) – 491;

Диагностическая чувствительность составляет (95% ДИ) – 98,3% (96,0–99,2%);

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ) – 99,4% (98,1–99,9%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», с соблюдением 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	–	–
ПЦР-буфер (фон)	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%	Является безопасным для конечного пользователя

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 исключен.

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	Real-time		Flash
	Фасовка S	Фасовка U	
ПЦР-бокс	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	нет
Детектор флуоресценции ДФ-520/560-«ДЖИН», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01274 или Детектор флуоресцентный «ДЖИН-4», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01249	нет	нет	да
Термостат программируемый ТП4-ПЦР-01-«Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ №ФСР 2007/01275	нет	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да ²	да	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл	да	да ³	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да ²	нет	нет
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,5 мл	нет	нет	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл	да	да	да
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 20 мкл	да	да	да
одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да
пробирки амплификационные объемом 0,2 мл с крышками	нет	да ³	нет
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да	да
транспортная среда (при необходимости)	да	да	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)	да	да	да

¹ – далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже

² – только для фасовки S, стрипы

³ – только для ручного дозирования

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Real-time		Flash
	Фасовка S	Фасовка U	
Устройство дозирующее ДТстрим в варианте исполнения 12M1 или 15M1, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/2982	нет	да ¹	нет
одноразовые наконечники с фильтром для дозирующего устройства ДТстрим в комплектации *M1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	да ¹	нет
Устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология»	нет	да ¹	нет
центрифуга с RCF (g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	да ¹	нет
полимерная термопленка для запечатывания микропланшетов 384 лунки	нет	да ¹	нет
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да ¹	нет
Набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала ² : – Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС по ТУ 9398-035-46482062-2009 в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867; – Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в форме комплектации: ПРОБА-ГС, ООО «НПО ДНК-Технология», 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 «НПО ДНК-Технология», РУ № ФСР 2008/02939			

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/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек;
- точность поддержания и однородность температуры не более $\pm 0,4$ °С.

¹ – только для автоматизированного дозирования

² – возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК *Candida albicans* определяется видом биологического материала

Для работы с набором реагентов валидированы следующие детектирующие амплификаторы:

- «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *М*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229;
- «ДТпрайм» (модификация «ДТпрайм *Х*») ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 (только для набора реагентов в фасовке U для автоматизированного дозирования);
- «ДТлайт» (модификация «ДТлайт *S*»), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228;
- Rotor-Gene Q, QIAGEN GmbH, Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 (только для набора реагентов в фасовке S, пробирки; в фасовке U для ручного дозирования);
- CFX96, Био-Рад Лабораториес, Инк; США, РУ № ФСЗ 2008/03399;
- Applied Biosystems QuantStudio 5, «Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.», Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446.

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, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаза), 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 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 предварительная обработка образцов биологического материала (6.5).

6.3.1 Соскобное отделяемое урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры), ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаза

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения, согласно установленной в зависимости от источника биологического материала процедуре.

ВНИМАНИЕ! Использование цитощёток для взятия соскобов из урогенитального тракта противопоказано при беременности.

Ограничение метода¹:

при взятии соскобов из урогенитального тракта – местное применение лекарственных препаратов, УЗИ вагинальным датчиком менее чем за 24 часа до исследования;

при взятии ректальных соскобов – использование ректальных свечей, слабительных препаратов, медикаментов, содержащих высокий процент железа, кольпоскопия менее чем за 48 часов 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 «НПО ДНК-Технология»).

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.

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

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

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.

6.3.1.5 Особенности взятия материала с конъюнктивы глаза

При наличии обильного гнойного отделяемого его убирают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором. Соскоб берут с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. При взятии соскоба необходимо придерживать веко руками, чтобы при моргании ресницы не касались зонда.

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 Остаточная моча после массажа простаты

Перед взятием остаточной мочи после массажа простаты рекомендуется половое воздержание в течение трех суток до исследования.

Пациент мочится в туалете, оставляя часть мочи в мочевом пузыре.

Перед сбором мочи головку полового члена обрабатывают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

Пациенту проводят массаж предстательной железы в течение 1–3 минут. Интенсивность массажа зависит от консистенции простаты: при мягкой предстательной железе осуществляют несильные надавливания, при плотной консистенции простаты силу давления увеличивают.

Сбор остаточной мочи осуществляется пациентом после окончания массажа. Взятие первой порции мочи проводится в сухой стерильный контейнер объёмом до 60 мл, снабжённый герметично закручивающейся крышкой, в количестве 10–15 мл.

После сбора материала контейнер плотно закрывают и маркируют.

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

6.3.5 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 объемом до 60 мл, снабженный 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 рекомендуемых 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 18 °С до минус 22 °С 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.

6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия 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 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, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+). При использовании набора реагентов в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» промаркируйте дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

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 (вариант исполнения «Real-time») или не более чем на 10 постановок при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца, 1 положительного контрольного образца и 2 пробирок «ФОН» (вариант исполнения «Flash») в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 образца. Для этого нужно:

- «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» (Real-time): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.
- «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» (Flash): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-», одну пробирку для «К+», две пробирки «ФОН». Общее количество пробирок – 8.

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

7.2.3 Добавьте в каждую пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы. Добавьте в пробирки, промаркированные «ФОН», по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).

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. Закройте пробирки/стрипы.

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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000–16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 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 с препаратом ДНК 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. Закрывайте 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–», «К+» и «ФОН», ДНК не вносится.

7.2.7 Внесите в пробирки, промаркированные «К–» и «ФОН», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

Примечание – Готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии набора реагентов при условии использования того же набора/комплекта реагентов для выделения ДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение одного месяца. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (от 18 °С до 25 °С), для этого за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

- 7.2.8 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 программируемый термостат/амплификатор или в детектирующий амплификатор.
- 7.2.11 Для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке»: Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, в режиме, приведённом в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для амплификаторов с активным регулированием (например, программируемый термостат Терцик). Время в скобках указано для амплификаторов без активного регулирования.

№ п.п.	Температура, °С	Время		Количество циклов
		мин	с	
1	94,0	1	00	1
2	94,0	0	05 (50)	5
	64,0	0	05 (50)	
	67,0	0	05 (50)	
3	94,0	0	01 (50)	40
	64,0	0	05 (50)	
	67,0	0	05 (50)	
4	10,0	...	...	Хранение

Примечание – Более подробное описание программирования и управления программируемым термостатом «Терцик» содержится в инструкции по эксплуатации прибора (см. «Руководство пользователя»).

- 7.2.12 Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени»:
 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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов

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

на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

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

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 4, 5, 6 соответственно.

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка S)

№ 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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ – режим оптических измерений						

Таблица 4 – 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			

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

Таблица 5 – 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	0:15	50
4	64 √	0:20	
√ – режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex) при 64 °C			

Таблица 6 – 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	0:20	50
	2	64 ✓	0:20	
✓ – 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 «К–» и 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 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 в пробирки со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ. 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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000–16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 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 с препаратом ДНК 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. Закрывайте 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 количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

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

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 5, 6, 8 соответственно.

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

Таблица 7 – 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	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

Таблица 8 – 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

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

ВНИМАНИЕ!

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

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

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-вортке в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1–3 с.
- 7.4.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq МАХ на микроцентрифуге-вортке в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке 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-вортке в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1–3 с.
- 7.4.5 Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1–3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1–3 с.
2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3–5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000–16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится на микроцентрифуге-вортке в течение 3–5 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-вортке в течение 1–3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК 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-вортке в течение 3–5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортке в течение 1–3 с.

- 7.4.6 Установите пробирки: со смесью для амплификации, со смесью ПЦР-буфера и полимеразы ТехноTaq MAX, с препаратами ДНК, отрицательными контрольными образцами и положительными контрольными образцами, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.
- 7.4.7 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет в подложку устройства для запечатывания планшет ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.4.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термопленкой согласно инструкции к прибору 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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора

После прохождения реакции амплификации поместите пробирки в ПЦР-детектор, оформите протокол и проведите регистрацию результатов в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75–2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

8.2 Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов

Регистрация сигнала флуоресценции на детектирующих амплификаторах серии ДТ, Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5 проводится 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 ПЦР-детектором или 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 9. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 9 – Интерпретация результатов ПЦР

Flash	Real-time		Интерпретация результата
Результат, полученный на флуоресцентном детекторе «ДЖИН» или «ДЖИН-4»	Канал детекции Fam/Green (искомая ДНК), Cp/Cq/Ct	Канал детекции Hex/Yellow/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы			
«+»	Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>Candida albicans</i> («+»)
«-»	Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Candida albicans</i> («-»)
«нд»	Не указан	Не указан	Недостоверный результат («нд»)
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 необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение ДНК и постановку ПЦР для этого образца, либо 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 Допускается транспортирование набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.
- 10.1.3 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U) в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С не более 5 суток.
- 10.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

- 10.2.1 Все компоненты набора реагентов, за исключением полимеразы ТехноТaq МАХ (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.2.3 Смесь для амплификации и смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.2.4 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
- 10.3.2 Для получения 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 (фасовка U), следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;
- полимеразу ТехноТaq МАХ (фасовка U) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °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.

10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клиничко-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 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 приемка 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 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 52905-2007 (ИСО 15190:2003) 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

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

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

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ – режим оптических измерений						

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Candida albicans</i>	ВК	–	–	–

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

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

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

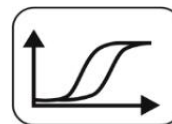
№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	5	15		Цикл
	94	0	5			
2	94	5	00	1		Цикл
3	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
5	94	0	5	1		Цикл
6	10 ¹	...	...	Хранение		Хранение

√ – режим оптических измерений

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
<i>Candida albicans</i>	BK	–	–	–

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C



449-5 2025-03-01



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК цитомегаловируса человека (CMV)
методом полимеразной цепной реакции

ЦМВ-ГЕН

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03945 от 27 февраля 2025 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	6
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	7
2.1 Состав набора реагентов.....	7
2.2 Количество анализируемых образцов.....	8
2.3 Принцип метода	8
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
3.1 Аналитическая специфичность	9
3.2 Интерферирующие вещества	9
3.3 Предел обнаружения	10
3.4 Диагностические характеристики.....	10
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	11
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	13
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	16
6.1 Материал для исследования	16
6.2 Общие требования	16
6.3 Взятие материала на исследование	16
6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала.....	21
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	22
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	22
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	22
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	25
7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	29
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	30
9 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	31
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	32
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	33
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	33
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	33
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	34
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	35
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	36
Приложение А.....	37
Приложение Б.....	38

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

CMV	- от англ. Cytomegalovirus
RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
ВК	- внутренний контроль
ЦМВ	- цитомегаловирус
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
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РНКаза	- рибонуклеаза

ВВЕДЕНИЕ

ЦМВ-инфекция широко распространена в разных возрастных группах. Инфицированный человек является резервуаром вируса, и передача инфекции происходит через прямой контакт с инфицированным человеком или его выделениями (грудное молоко, слюна, моча), путем полового контакта, переливания инфицированной крови или через зараженный трансплантат. ЦМВ может выступать в качестве коинфекции при инфекционно-воспалительных урогенитальных заболеваниях, она является наиболее частой врожденной вирусной инфекцией [1-6]. Инфицирование плода происходит трансплацентарно во время первичной и вторичной инфекций у беременных женщин. Для новорожденных, инфицированных во время беременности, существует риск возникновения осложнений в виде потери слуха или нарушения зрения, замедления развития, трудностей с обучением, двигательных расстройств, эпилепсии [7-9].

ЦМВ-инфекция является также одним из основных осложнений после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и может вызвать мультиорганное заболевание, как на ранних, так и на более поздних этапах после трансплантации [10], особенно при проведении сильной иммуносупрессии [11]. Применение набора реагентов для выявления ДНК цитомегаловируса человека (CMV) методом полимеразной цепной реакции 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 цитомегаловирусную инфекцию при проведении дифференциальной диагностики заболеваний.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sekhon H.S., Press R.D., Schmidt W.A. et al. Identification of cytomegalovirus in a liquid-based gynecologic sample using morphology, immunohistochemistry, and DNA real-time PCR detection. *Diagn Cytopathol.* 2004 Jun; 30(6):411-7.
2. Shen C.Y., Chang S.F., Lin H.J. et al. Cervical cytomegalovirus infection in prostitutes and in women attending a sexually transmitted disease clinic. *J Med Virol.* 1994 Aug; 43(4):362-6.
3. McGalie C.E., McBride H.A., McCluggage W.G. Cytomegalovirus infection of the cervix: morphological observations in five cases of a possibly under-recognised condition. *J Clin Pathol.* 2004 Jul; 57(7):691-4.
4. Ross S.A., Novak Z., Ashrith G. et al. Association between genital tract cytomegalovirus infection and bacterial vaginosis. *J Infect Dis.* 2005 Nov 15; 192(10):1727-30.
5. Sewell C.A., Anderson J.R. Cytomegalovirus disease in the lower female genital tract. *AIDS Patient Care STDS.* 2001 Sep; 15(9):459-62.
6. Naumenko V., Tyulenev Y., Kurilo L. et al. Detection and quantification of human herpes viruses types 4-6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases. *Andrology.* 2014 Sep; 2(5):687-94.
7. Boppana S.B., Fowler K.B., Vaid Y., et al. Neuroradiographic findings in newborn period and long-time outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1997; 99: 409-14.
8. Yamamoto A.Y., Mussi-Pinhata M.M., Issac Mde L. et al. Congenital cytomegalovirus infection as a cause of sensorineural hearing loss in a highly immune population. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: 1043-6.
9. Morton C.C., Newborn hearing screening - a silent revolution, *N Engl J Med* 2006; 354: 2151-2164.
10. Styczyński J.: Infections in Polish pediatric hematology, oncology and stem cell transplantation centers in 2012- 2013: Incidence report. *Med Biol Sci* 2014; 28:55-61.
11. Ljungman P., de la Camara R., Cordonnier C. et al. Management of cmv, hhv-6, hhv-7 and kaposi sarcoma herpesvirus (hhv-8) infections in patients with hematological malignancies and after sct. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42:227-240.

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК цитомегаловируса человека (CMV) методом полимеразной цепной реакции (ЦМВ-ГЕН), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК цитомегаловируса человека (CMV) методом ПЦР в биологическом материале человека: соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта и конъюнктивы глаза, моча, секрет простаты, эякулят, слюна, грудное молоко, периферическая/пуповинная кровь, ликвор, амниотическая жидкость, образцы ткани.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению исследования: симптомы инфекционно-воспалительного заболевания мочеполового тракта, ротоглотки, глаз, центральной нервной системы, симптомы внутриутробной инфекции у плода во время беременности, контроль лечения цитомегаловирусной инфекции, обследование перед проведением трансплантаций.

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-P204-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-P204-23/9, 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-P204-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 «K+»

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
CMV	ВК	-	-	-

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

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

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК CMV, программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательный результат амплификации специфического продукта (фрагмента генома CMV) 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 *Chlamydia trachomatis*, Herpes simplex virus 1, 2, Human herpesvirus 6, Human herpesvirus 8, Epstein-Barr virus, Varicella zoster virus, HPV 6, HPV 11, 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 CMV 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	93	98,9
2	94	73	77,7
1	94	56	59,6
0	94	0	0,0

Примечание – Предел обнаружения ДНК CMV 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 CMV 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) – 424;

Диагностическая чувствительность составляет (95% ДИ): 98,0% (91,8-98,0%);

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ): 100% (99,2-100%).

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 клинко-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 объемом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл	нет	да	да	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
дозаторы механические или электронные переменного объема одноканальные, позволяющие отбирать объем жидкости от 2,0 до 200 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, объемом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	да	да	да	да
пробирки амплификационные объемом 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, объемом 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 ПЦР	нет	нет	нет	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	нет	нет	да

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы ¹	пробирки	ручное	автоматизированное
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)				
транспортная среда (при необходимости), рекомендуются: - 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 уrogenитального тракта)				
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; - Комплект реагентов для выделения ДНК ПРОБА-РАПИД по ТУ 9398-015-46482062-2008, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2008/02939; - 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.				
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 - только детектирующий амплификатор «ДТпрайм» (модификация ДТпрайм *Х*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 ⁴ - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК CMV 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 °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 и с конъюнктивы глаза, мочу, секрет простаты, эякулят, слюну, грудное молоко, периферическую/пуповинную кровь, ликвор, амниотическую жидкость, образцы ткани.

6.2 Общие требования

6.2.1 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.

6.2.2 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.

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

6.2.4 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) и конъюнктивы глаза

Ограничение метода¹: местное применение лекарственных препаратов; при взятии соскобов из урогенитального тракта – 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/комплексам реагентов для выделения НК

- 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:
 - 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.

6.3.1.5 Особенности взятия материала с конъюнктивы глаз

При наличии обильного гнойного отделяемого его убирают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором. Соскоб берут с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. При взятии соскоба необходимо придерживать веко руками, чтобы при моргании ресницы не касались зонда.

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 вершечке 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 Остаточная моча после массажа простаты

Перед взятием остаточной мочи после массажа простаты рекомендуется половое воздержание в течение трех суток до исследования.

Пациент мочится в туалете, оставляя часть мочи в мочевом пузыре.

Перед сбором мочи головку полового члена обрабатывают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

В течение 1-3 минут пациенту проводят массаж предстательной железы. Интенсивность массажа зависит от консистенции простаты: при мягкой предстательной железе осуществляют несильное надавливание, при плотной консистенции простаты силу давления увеличивают.

После массажа простаты пациент собирает первые 10-15 мл мочи в стерильный пластиковый контейнер для сбора мочи, объёмом до 60 мл.

Ёмкость с мочой герметично закрывают крышкой и маркируют.

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

6.3.5 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 объемом до 60 мл, снабженный герметично закручивающейся крышкой. После сбора материала контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.3.6 Слюна, ликвор, амниотическая жидкость

Слюну, ликвор, амниотическую жидкость (примерно 500 мкл) собирают в стерильную посуду и плотно закрывают крышкой.

Переносят 500 мкл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Центрифугируют пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

Удаляют надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

Добавляют к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного.

Центрифугируют пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С.

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

6.3.7 Грудное молоко

Собирают материал в стерильную посуду и плотно закрывают крышкой.

Аккуратно перемешивают и переносят 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Примечание – Срок сбора молока не более 24 часов. Хранение в течение всего срока сбора при температуре от 2 °С до 8 °С.

6.3.8 Периферическая/пуповинная кровь

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

Ограничение метода¹: внутривенные инъекции гепарина, инфузии препаратов для парентерального питания – менее чем за 6 часов до исследования.

6.3.9 Образцы ткани

В одноразовые стерильные пробирки объемом 2,0 мл, содержащие соответствующую транспортную среду, помещают кусочки ткани диаметром не более 5,0 мм. После взятия материала пробирки 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 НК (7.1) или используемых для транспортирования и хранения образцов транспортных сред.

Допускается хранение образцов биологического материала 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 или используемым для транспортирования и хранения образцов транспортным средам).

ВНИМАНИЕ! Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

¹ - если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектam реагентов для выделения НК

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-» и «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 прикройте 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 CMV
Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК CMV
Не указан	Не указан	Недостовверный 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 Недостовверный 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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 холодоэлементами 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 ЦМВ-ГЕН
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, °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 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

- 4) Внести следующие параметры каналов детекции:

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
CMV	ВК	-	-	-

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 ЦМВ-ГЕН
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
CMV	ВК	-	-	-

¹ - допускается хранение при температуре 10 °C



1093 2025-02-15



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, Cytomegalovirus

методом ПЦР в режиме реального времени

HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс

Регистрационное удостоверение

№ РЗН 2025/24371 от 07 февраля 2025 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	4
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
2.1	Состав набора реагентов.....	5
2.2	Количество анализируемых образцов.....	6
2.3	Принцип метода	6
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
3.5	Воспроизводимость и повторяемость	9
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	10
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	12
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	15
6.1	Материал для исследования	15
6.2	Общие требования	15
6.3	Взятие материала на исследование	15
6.4	Транспортирование и хранение образцов биологического материала	17
6.5	Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК	17
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	18
7.1	Выделение ДНК из биологического материала	18
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	25
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	27
9	УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	28
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ.....	29
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	31
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	31
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	31
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:

CMV	- от англ. Cytomegalovirus
HSV1	- от англ. Herpes simplex virus 1
HSV2	- от англ. Herpes simplex virus 2
RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
БК	- внутренний контроль
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
РНКазы	- рибонуклеазы

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, Cytomegalovirus методом ПЦР в режиме реального времени (HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2, Cytomegalovirus в биологическом материале человека (моча, соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта) методом ПЦР в режиме реального времени.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению анализа: симптомы инфекционного заболевания урогенитального тракта.

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

Набор реагентов для выявления ДНК Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, Cytomegalovirus методом ПЦР в режиме реального времени (HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс) выпускается в стандартной фасовке (маркируется – фасовка S, стрипы; фасовка S, пробирки) и в универсальной фасовке для ручного и автоматизированного дозирования (маркируется – фасовка U).

2.1 Состав набора реагентов

REF R1-P211-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 Taq-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-P211-23/9, 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 Taq-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-P211-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 ТехноTaq 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+»

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.

2.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов в фасовке S рассчитан на 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; мультиплексный качественный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. Для фасовки S «горячий» старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью 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 неспецифическое связывание праймеров с ДНК-мишенью при начальном прогреве пробирки.

В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется 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-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК Herpes simplex virus 2, включена флуоресцентная метка Fam. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК Cytomegalovirus, включена флуоресцентная метка Rox. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации ДНК Herpes simplex virus 1, включена флуоресцентная метка Cy5. В состав ДНК-зонда, использующегося для детекции продукта амплификации внутреннего контроля, входит флуоресцентный краситель Hex.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок и биоматериала, необходимого для проведения исследования, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

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
Herpes simplex virus 2 (HSV2)	ВК	Cytomegalovirus (CMV)	Herpes simplex virus 1 (HSV1)	–

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК с одновременной детекцией результатов в режиме реального времени с использованием набора реагентов HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

В образцах биологического материала, содержащих ДНК выявляемых микроорганизмов, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать положительные результаты амплификации специфических продуктов (фрагментов геномов *Herpes simplex virus 1*, *Herpes simplex virus 2* или *Cytomegalovirus*) по заявленным каналам детекции.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК выявляемых микроорганизмов при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора должно регистрировать отрицательные результаты амплификации специфических продуктов (фрагментов геномов *Herpes simplex virus 1*, *Herpes simplex virus 2* или *Cytomegalovirus*) по заявленным каналам детекции и положительный результат амплификации внутреннего контроля по каналу детекции Hex/Yellow/Vic.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК *Varicella-zoster virus*, *Epstein-Barr virus*, *Human herpesvirus 6*, *Human herpesvirus 7*, *Human herpesvirus 8*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Parvovirus B19*, *Chlamydia pneumonia*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, 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 отнесены следующие вещества: гемоглобин и лекарственные препараты, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления в процессе выделения ДНК из образца биоматериала, 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 лабораторных контрольных образцов 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.

Для оценки возможной интерференции лекарственных препаратов были выбраны те, которые потенциально могут присутствовать в остаточных количествах в биологических образцах человека, взятых из соответствующих исследуемых биотопов (Мирамистин®, хлоргексидин биглюконат).

Для всех исследуемых лекарственных препаратов было показано отсутствие их влияния в концентрации до 10% в образце биоматериала.

3.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения составляет по 5 копий ДНК каждого микроорганизма на амплификационную пробирку.

Предел обнаружения установлен путём анализа серийных разведений двух серий лабораторных контрольных образцов (ЛКО).

Предел обнаружения соответствует следующим значениям концентрации ДНК при использовании указанных наборов/комплектов реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения) выделенной ДНК:

Биоматериал	Наименование набора/комплекта реагентов для выделения ДНК	Объём полученного препарата, мкл	Предел обнаружения, копий/образец
Соскобы эпителиальных клеток в 500 мкл транспортной среды ¹ , моча (1,0 мл)	ПРОБА-НК	50	50
	ПРОБА-НК-ПЛЮС	300	300
	ПРОБА-ГС	100	100
	ПРОБА-ГС-ПЛЮС	300	300
	ПРОБА-РАПИД	500	500
	ПРОБА-МЧ-РАПИД ²	100	100
	ПРОБА-МЧ-РАПИД II	100	100
	ПРОБА-ОПТИМА	400	400

3.4 Диагностические характеристики

Вид биоматериала	Аналит	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта	HSV1	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	HSV2	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	CMV	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
Моча	HSV1	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	HSV2	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)
	CMV	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)	100% (95% ДИ: 86,28% – 100%)

3.5 Воспроизводимость и повторяемость

Воспроизводимость составляет 100%.

Повторяемость составляет 100%.

¹ – в качестве транспортной среды использовалась Транспортная среда для биопроб СТОР-Ф, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640

² – только для соскобов эпителиальных клеток

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 исключен.

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 объемом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл	нет	да	да ⁴	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да	нет	нет	нет
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объем жидкости от 0,5 до 10 мкл, от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл	да	да	да	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл	да	да	да	да
штатив для дозаторов	да	да	да	да
пробирки микроцентрифужные объемом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз	нет	нет	да	да
пробирки амплификационные объемом 0,2 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз или микропланшет ПЦР 96 лунок ⁵	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 ДТстрим 12М1 или ДТстрим 15М1, 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 *М1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 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	да ⁶	да
центрифуга с RCF(g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	нет	да ⁶	да
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов ПЦР	нет	нет	да ⁶	да
микропланшет 384 лунки	нет	нет	нет	да
транспортная среда (при необходимости), рекомендуется использовать Транспортную среду для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640 или Транспортную среду 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)				
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)				

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы ¹	пробирки	ручное	автоматизированное
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала⁷, рекомендуются: – Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009 в формах комплектации: комплект ПРОБА-НК, комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС, 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 и ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2010/08696; – Комплект реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-РАПИД) по ТУ 9398-015-46482062-2008, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2008/02939; – Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ) по ТУ 9398-088-46482062-2016 в комплектации ПРОБА-МЧ-РАПИД, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2017/5753; – Набор реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА ОПТИМА) по ТУ 21.20.23-124-46482062-2021, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/17496; – Набор реагентов для выделения ДНК/РНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека (ПРОБА-МЧ-РАПИД II) по ТУ 21.20.23-136-46482062-2023, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2024/23205.				
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 – только при использовании пробирок ⁵ – не используется для детектирующих амплификаторов «ДТлайт» и Rotor-Gene Q ⁶ – только при использовании микропланшетов ⁷ – 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 объемом реакционной смеси 35 мкл (фасовка S) или 18 мкл (фасовка U);
- обеспечивается работа с флуорофорами: Fam, Hex (Vic), Rox, Cy5;
- 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 ± 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 при использовании пробирок), 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), 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 мочу, соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта.

6.2 Общие требования

6.2.1 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.

6.2.2 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.

6.2.3 При необходимости взятия соскобов из нескольких биотопов повторите процедуру, каждый раз забирая материал в новую пробирку.

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

6.2.5 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 (6.5).

6.3.1 Моча

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

6.3.2 Соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения, согласно установленной в зависимости от источника биологического материала процедуре (например, Зонды медицинские по ТУ 9436-002-98349125-2016 в вариантах исполнения: 1. Зонд тип А универсальный: – тип А1, производство ООО «Медицинские изделия», Россия, РУ № РЗН 2018/7058).

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

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

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

6.3.2.1 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.

6.3.2.2 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.

6.3.2.3 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.

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

6.3.2.4 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.

6.4 Транспортирование и хранение образцов биологического материала

6.4.1 Моча

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

Образцы мочи допускается транспортировать и хранить (если это не противоречит требованиям к используемым наборам/комплектам реагентов для выделения НК):

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более одних суток;
- при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С – не более одной недели.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.4.2 Соскобы эпителиальных клеток из уrogenитального тракта

Условия транспортирования и хранения соскобов из уrogenитального тракта определяются инструкциями по применению рекомендуемых 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/комплектам реагентов для выделения НК).

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

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-РАПИД (не рекомендуется для соскобов из урогенитального тракта у мужчин), ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-ОПТИМА, ПРОБА-МЧ-РАПИД II (таблица 2).

Таблица 2 – Наборы/комплекты реагентов, рекомендованные для выделения ДНК для дальнейшего исследования с использованием набора реагентов HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс

Набор/комплект реагентов, РУ	Биоматериал	Минимальное количество элюата, мкл
Комплект реагентов ПРОБА-НК, РУ № ФСР 2010/08867	Моча, соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта	50
Комплект реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС, РУ № ФСР 2010/08867	Моча, соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта	300
Комплект реагентов ПРОБА-ГС, РУ № ФСР 2010/08696	Моча, соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта	100
Комплект реагентов ПРОБА-ГС-ПЛЮС, РУ № ФСР 2010/08696	Моча, соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта	300
Набор реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД, РУ № РЗН 2017/5753	Соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта	100
Комплект реагентов ПРОБА-РАПИД, РУ № ФСР 2008/02939	Моча, соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта	500
Набор реагентов ПРОБА-ОПТИМА, РУ № РЗН 2022/17496	Моча, соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта	400
Набор реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД II, РУ № РЗН 2024/23205	Моча, соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта	100

Выделение ДНК из исследуемого материала 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.
- 7.2.1. 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-РАПИД, ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС и 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 наборов 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.

7.2.5 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.

7.2.6 Внесите в пробирку, промаркированную «К–», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).

7.2.7 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.8 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).

7.2.9 Установите все пробирки/стрипы в детектирующий амплификатор.

7.2.10 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 и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

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

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

Проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведенным в таблицах 4, 5, 6 соответственно.

Таблица 3 – 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 ¹	...	...	Хранение		Хранение
√ – режим оптических измерений						

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	0:15	50
4	64 √	0:20	
√ – режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex, Rox, Cy5) 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	0:20	50
	2	62 √	0:20	
√ – сбор данных для необходимых флуорофоров (Fam, Vic (Hex), Rox, Cy5) включен				

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C

Таблица 6 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q (фасовка S, пробирки)

№/ Cycling	Температура/ Temperature	Время/ Hold Time	Количество циклов/ Cycle Repeats
Cycling 1	80 deg	60 sec	1 time
	94 deg	90 sec	
Cycling 2	94 deg	30 sec	5 times
	62 deg ✓	15 sec	
Cycling 3	94 deg	10 sec	45 times
	62 deg ✓	15 sec	
✓ – режим оптических измерений установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам детекции Green, Yellow, Orange и Red при 62 °C			

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование

ВНИМАНИЕ!

1. Для амплификации следует использовать одноразовые амплификационные пробирки объемом 0,2 мл или микропланшеты ПЦР 96 лунок¹, герметизируемые термоплёнкой. Не рекомендуется использовать стрипованные пробирки в связи с опасностью постаmplификационной контаминации.

2. 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 или микропланшет ПЦР 96 лунок 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/зарезервировать 4 лунки микропланшета для неизвестных образцов, одну пробирку/лунку для «К-» и одну пробирку/лунку для «К+». Общее количество пробирок/лунок – 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/необходимые лунки микропланшета (включая «К-» и «К+») по 6,0 мкл смеси для амплификации.

7.3.4 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноTaq MAX на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

¹ – для детектирующих амплификаторов «ДТлайт» микропланшеты 96 лунок не используются

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/количество необходимых лунок микропланшета с учётом «К–», «К+».

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца, «К–», «К+». Промаркированных пробирок/необходимых лунок микропланшета – 6. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ для 7 (6+1) пробирок/лунок, 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/необходимые лунки микропланшета 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/лунки со смесью для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить 7.3.8 – 7.3.14.

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/лунки 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-РАПИД, ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС и 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 наборов 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/необходимые лунки микропланшета по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки/лунки, промаркированные «К–» и «К+», ДНК не вносится.

7.3.10 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К–», 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.7.1).

7.3.11 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К+», 6,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.12 В случае использования микропланшетов ПЦР 96 лунок:

7.3.12.1 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.

7.3.12.2 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.

7.3.12.3 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.3.13 В случае использования пробирок:

Центрифугируйте все пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.3.14 Установите все пробирки/микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР (7.3.15, 7.3.16).

7.3.15 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 образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

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

7.3.16 Для детектирующих амплификаторов CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:
Проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 18 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 4, 5 соответственно.

Таблица 7 – 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						

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

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C

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 и полимеразы 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-РАПИД, ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС и 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 наборов 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, пробирки или глубоколоночные планшеты 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 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 Учет 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	Rox/Orange, Cp/Cq/Ct	Cy5/Red, Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы				
Указан	Не учитывается	Не указан	Не указан	Обнаружена ДНК Herpes simplex virus 2 (HSV2)
Не указан	Не учитывается	Указан	Не указан	Обнаружена ДНК Cytomegalovirus (CMV)
Не указан	Не учитывается	Не указан	Указан	Обнаружена ДНК Herpes simplex virus 1 (HSV1)
Не указан	Указан	Не указан	Не указан	Не обнаружена ДНК выявляемых микроорганизмов
Не указан	Не указан	Не указан	Не указан	Недостоверный результат
Отрицательный контрольный образец				
Не указан	Указан	Не указан	Не указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец				
Указан	Указан	Указан	Указан	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 Если для биологического образца получены значения Cp/Cq/Ct менее 24 по каналам детекции Fam/Green, Rox/ Orange или Cy5/Red, то это говорит о высокой первоначальной концентрации ДНК соответствующего микроорганизма. В данном случае возможно получение ложноотрицательного результата для микроорганизма, ДНК которого присутствует в низкой концентрации. Для исключения ложноотрицательных результатов

рекомендуется повторно провести ПЦР выделенного препарата ДНК с использованием Набора реагентов для выявления ДНК вируса простого герпеса человека 1, 2 типов (HSV 1, 2) методом полимеразной цепной реакции (ВПГ-ГЕН), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2008/03946 и Набора реагентов для выявления ДНК цитомегаловируса человека (CMV) методом полимеразной цепной реакции (ЦМВ-ГЕН), ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № ФСР 2008/03945.

9.6 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.

9.7 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 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3 Фасовка U

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

10.1.3.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера до 25 °С 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 °С до 8 °С 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 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 следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2.2 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.

10.2.3 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 (фасовка U) 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 клиничко-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>		Номер по каталогу
	Температурный диапазон		Изготовитель
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Не допускать воздействия солнечного света
	Использовать до		Нестерильно
	Код партии (серии)		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Дата изготовления		

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 приемка 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 HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс
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
Herpes simplex virus 2 (HSV2)	ВК	Cytomegalovirus (CMV)	Herpes simplex virus 1 (HSV1)	–

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 HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс
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, °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
Herpes simplex virus 2 (HSV2)	БК	Cytomegalovirus (CMV)	Herpes simplex virus 1 (HSV1)	–

¹ – допускается хранение при температуре 10 °C



453 2024-12-19



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Toxoplasma gondii*
методом ПЦР в режиме реального времени

Toxoplasma gondii

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2024/24242 от 16 декабря 2024 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ.....	4
2	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
2.1	Состав набора реагентов.....	5
2.2	Количество анализируемых образцов.....	6
2.3	Принцип метода	6
2.4	Время проведения анализа	7
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
3.1	Аналитическая специфичность	7
3.2	Интерферирующие вещества	7
3.3	Предел обнаружения	8
3.4	Диагностические характеристики.....	9
3.5	Воспроизводимость и повторяемость	9
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	9
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	12
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.....	15
6.1	Материал для исследования	15
6.2	Общие требования	15
6.3	Взятие материала на исследование.....	15
6.4	Транспортирование и хранение образцов биологического материала.....	16
6.5	Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК	16
7	ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	17
7.1	Выделение ДНК из биологического материала	17
7.2	Выделение ДНК из биоптатов/пунктатов с использованием комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-ГС.....	17
7.3	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	21
7.4	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование	24
7.5	Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, с использованием дозирующего устройства ДТстрим	28
8	РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	30
9	УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	30
10	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	31
11	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	32
12	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ.....	32
13	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	32
14	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	33
15	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	34
16	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ.....	35
	Приложение А.....	36
	Приложение Б.....	37

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

RCF	- от англ. relative centrifugal force, относительное ускорение центрифуги
ВК	- внутренний контроль
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	- рибонуклеазы

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 Полное наименование набора реагентов: Набор реагентов для выявления ДНК *Toxoplasma gondii* методом ПЦР в режиме реального времени (*Toxoplasma gondii*), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Назначение: набор реагентов предназначен для выявления ДНК *Toxoplasma gondii* в биологическом материале человека (кровь, спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость, биоптат или пунктат из очагов поражения органов и тканей) методом ПЦР в режиме реального времени.

1.3 Функциональное назначение: диагностика *in vitro*.

1.4 Показания к проведению исследования: симптомы инфекционного или воспалительного заболевания, вызванного *Toxoplasma gondii*.
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-P031-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 Taq-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-P031-23/9, 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 Taq-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-P031-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 ТехноTaq 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 «K+»

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 несёт 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>Toxoplasma gondii</i>	ВК	-	-	-

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка), ПЦР-амплификация ДНК с одновременной детекцией результатов с использованием набора реагентов *Toxoplasma gondii*.

2.4 Время проведения анализа (включая пробоподготовку): от 2 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора/комплекта реагентов для выделения ДНК).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Аналитическая специфичность

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

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

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК следующих микроорганизмов: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2, Cytomegalovirus, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, 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/недостовверных) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см.2.3, 9.3, 9.4).

К ингибиторам ПЦР отнесены следующие вещества: гемоглобин и лекарственные препараты, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления в процессе выделения ДНК из образца биоматериала, 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 лабораторных контрольных образцов 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.

Для оценки возможной интерференции лекарственных препаратов были выбраны те, которые потенциально могут присутствовать в остаточных количествах в биологических образцах человека, взятых из соответствующих исследуемых биотопов (Мирамистин®, хлоргексидин биглюконат).

Для всех исследуемых лекарственных препаратов было показано отсутствие их влияния в концентрации до 10% в образце биоматериала.

3.3 Предел обнаружения

5 копий ДНК *Toxoplasma gondii* на амплификационную пробирку.

Предел обнаружения установлен путем анализа серийных разведений лабораторного контрольного образца (ЛКО).

Предел обнаружения соответствует следующим значениям концентрации ДНК при использовании указанных наборов/комплектов реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения) выделенной ДНК:

Биоматериал	Наименование комплекта/набора для выделения ДНК	Объем полученного препарата, мкл	Предел обнаружения, копий/образец
Спинномозговая жидкость (при выделении из 500 мкл образца)	ПРОБА-НК	50	50
	ПРОБА-ГС	100	100
	ПРОБА-МЧ-РАПИД	100	100
	ПРОБА-РАПИД	500	500
Амниотическая жидкость (при выделении из 500 мкл образца)	ПРОБА-МЧ-РАПИД	100	100
Спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость (при выделении из 1,0 мл образца)	ПРОБА-ОПТИМА	400	400
Биоптаты/пунктаты	ПРОБА-НК	50	50
	ПРОБА-ГС	100	100
	ПРОБА-ОПТИМА	400	400
Цельная периферическая кровь (500 мкл ¹)	ПРОБА-ОПТИМА МАКС	100	100
Цельная периферическая кровь (100 мкл)	ПРОБА-МЧ-МАКС	50	50

¹ - при добавлении 100 мкл лизирующего раствора

3.4 Диагностические характеристики

Вид биоматериала	Диагностическая чувствительность		Диагностическая специфичность	
	Исследовано образцов	Значение (95 % ДИ)	Исследовано образцов	Значение (95 % ДИ)
Кровь	25	100 % (86,28 % – 100 %)	25	100 % (86,28 % – 100 %)
Биоптаты, пунктаты из очагов поражения органов и тканей	30	100 % (88,43 % – 100 %)	50	100 % (92,89 % – 100 %)
Спинномозговая жидкость	25	100 % (86,28 % – 100 %)	25	100 % (86,28 % – 100 %)
Амниотическая жидкость	25	100 % (86,28 % – 100 %)	25	100 % (86,28 % – 100 %)
Итого	105	100 % (96,55 % – 100 %)	125	100 % (97,09 % – 100 %)

3.5 Воспроизводимость и повторяемость

Воспроизводимость составляет 100 %

Повторяемость составляет 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 клиничко-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 исключен.

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	пробирки	ручное	автоматизированное
ПЦР-бокс	да	да	да	да
амплификатор с детекцией в режиме реального времени ¹	да	да	да	да ²
микроцентрифуга-вортекс	да	да	да	да
ротор для микроцентрифуги-вортекса для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да ³	нет	нет	нет
холодильник с морозильной камерой	да	да	да	да
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл	нет	да	да ⁴	нет
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да ³	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 или микропланшет ПЦР 96 лунок ⁵	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
транспортная среда (при необходимости), рекомендуется использовать Транспортную среду для биопроб СТОР-Ф, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640	да	да	да	да
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)	да	да	да	да
Устройство дозирующее ДТстрим по ТУ 9443-005-96301278-2012 в варианте исполнения 12М1 или 15М1, 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 *М1, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл или рекомендованные для аналогичного используемого дозирующего устройства	нет	нет	нет	да

¹ - далее по тексту – детектирующий амплификатор; требуемые параметры детектирующих амплификаторов указаны ниже

² - только детектирующий амплификатор «ДТпрайм» (модификация ДТпрайм *Х*), ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229

³ - не используется для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

⁴ - только при использовании пробирок

⁵ - не используется для детектирующих амплификаторов «ДТлайт» и Rotor-Gene Q

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Фасовка S		Фасовка U, дозирование	
	стрипы	пробирки	ручное	автоматизированное
Устройство для запечатывания планшетов ДТпак, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия	нет	нет	да ¹	да
центрифуга с RCF (g) не ниже 100, с адаптером для микропланшетов	нет	нет	да ¹	да
полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшетов	нет	нет	да ¹	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	нет	нет	да
набор/комплект реагентов для выделения НК из биологического материала², 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; - Набор реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА-ОПТИМА³) по ТУ 21.20.23-124-46482062-2021, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2022/17496; - Набор реагентов для выделения ДНК ПРОБА-МЧ МАКС по ТУ 21.20.23-106-46482062-2019, ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2021/14391.				
Дополнительно для предобработки и выделения ДНК из биоптатов/пунктатов с использованием комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-ГС:				
бокс биологической безопасности II класса				
центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF(g) не ниже 12000				
термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65 °С				
электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей				
одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора				
холодильник с морозильной камерой				
микроцентрифуга-вортекс				
пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз				
штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл				
дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл				
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл, 1000 мкл				
штатив для дозаторов				
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные				
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов				
дезинфицирующий раствор				
физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости)				
транспортная среда (при необходимости)				

¹ - при использовании микропланшетов

² - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК Toxoplasma gondii определяется видом биологического материала (7.1)

³ - для выделения ДНК из крови только в варианте исполнения ПРОБА-ОПТИМА МАКС

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 при использовании пробирок), 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 при использовании пробирок), далее по тексту - Rotor-Gene Q;
- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000 с модулем реакционным оптическим CFX96 (Optical Reaction Module CFX96), Био-Рад Лабораториес, 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 кровь, спинномозговую жидкость, амниотическую жидкость, биоптаты или пунктаты из очагов поражения органов и тканей.

6.2 Общие требования

6.2.1 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.

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

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

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

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

6.2.4 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 (6.5).

6.3.1 Периферическая кровь

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

Ограничение метода¹: внутривенные инъекции гепарина, инфузии препаратов для парентерального питания – менее чем за 6 часов до исследования.

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

6.3.2 Спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

6.3.3 Биоптаты/пунктаты

Взятие материала проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-ГС: Взятие материала проводится в одноразовые пробирки объемом 1,5 мл с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований.

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 НК (7.1) или используемых для транспортирования и хранения образцов транспортных сред.

Допускается хранение образцов биологического материала 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/комплектам реагентов для выделения НК или используемым для транспортирования и хранения образцов транспортным средам).

ВНИМАНИЕ! Следует избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

6.5 Подготовка биологического материала человека для выделения ДНК

6.5.1 Периферическая кровь, спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

6.5.2 Биоптаты/пунктаты

Подготовка биологического материала (при необходимости) проводится в соответствии с инструкциями по применению используемых наборов/комплектов реагентов для выделения НК (7.1).

При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-ГС:

6.5.2.1 Встряхните пробирки с биоматериалом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

6.5.2.2 Удалите надосадочную жидкость.

Образец готов для выделения ДНК (7.2).

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, ПРОБА-ОПТИМА, ПРОБА-МЧ МАКС (таблица 2).

Таблица 2 – Наборы/комплекты реагентов, рекомендованные для выделения ДНК для дальнейшего исследования с использованием набора реагентов Toxoplasma gondii

Набор/комплект реагентов, РУ	Биоматериал	Минимальное количество элюата, мкл
Комплект реагентов ПРОБА-НК, РУ № ФСР 2010/08867	Спинномозговая жидкость, биоптаты, пунктаты	50
Комплект реагентов ПРОБА-ГС, РУ № ФСР 2010/08696	Спинномозговая жидкость, биоптаты, пунктаты	100
Набор реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД, РУ № РЗН 2017/5753	Спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость	100
Комплект реагентов ПРОБА-РАПИД, РУ № ФСР 2008/02939;	Спинномозговая жидкость	500
Набор реагентов ПРОБА-ОПТИМА, РУ № РЗН 2022/17496	Цельная периферическая кровь ¹	100
	Спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость, биоптаты/пунктаты	400
Набор реагентов ПРОБА-МЧ МАКС, РУ № РЗН 2021/14391	Цельная периферическая кровь	50

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.
- Выделение ДНК из биоптатов/пунктатов с использованием комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-ГС проводится согласно данной инструкции (7.2).

7.2 Выделение ДНК из биоптатов/пунктатов с использованием комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-ГС

7.2.1 Общие требования

- Используйте одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз. Используемые наконечники меняйте при каждом удалении раствора из

¹ - только с использованием набора реагентов в варианте исполнения ПРОБА-ОПТИМА МАКС

пробирки. При работе с аспиратором используйте наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз.

7.2.2.2 При добавлении раствора в пробирку, содержащую биологический материал, вносите раствор аккуратно, не касаясь стенок пробирки. При касании стенки пробирки смените наконечник.

7.2.2.3 Для предотвращения контаминации открывайте крышку только той пробирки, в которую будете вносить раствор или из которой будете удалять надосадочную жидкость, и закрывайте ее перед работой со следующей пробиркой. Не допускается работать одновременно с несколькими пробирками с открытыми крышками.

7.2.2.4 Неизвестные образцы и отрицательный контрольный образец (К-) необходимо обрабатывать по единой схеме одновременно согласно данной инструкции.

7.2.2 Выделение ДНК из биоптатов/пунктатов с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК

ВНИМАНИЕ!

1. Перед началом работы необходимо:

- включить термостат для прогрева до 65 °С;
- достать из холодильника комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот и проконтролировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка необходимо прогреть флакон с лизирующим раствором на термостате, предварительно прогревом до 65 °С, до полного растворения осадка. Затем следует перемешать раствор переворачиванием флакона вверх дном 5-10 раз, избегая пенообразования. Перед использованием охладите раствор до комнатной температуры (от 18 °С до 25 °С). Осадок также можно растворить при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) в течение приблизительно 12 часов.

2. При прогревании пробирок возможно открывание крышек! Следует использовать пробирки с защёлкивающимися крышками (например, Eppendorf Safe-Lock Tubes) или программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.», производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

7.2.2.1 Промаркируйте по одной одноразовой пластиковой пробирке объемом 1,5 мл для каждого неизвестного образца и для отрицательного контрольного образца (К-).

7.2.2.2 Добавьте в пробирки с подготовленными образцами биоптатов/пунктатов (см.6.5.2) и в пробирку «К-» по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирок.

7.2.2.3 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», 100 мкл отрицательного контрольного образца. Плотнo закройте пробирки, встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

7.2.2.4 Термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 30 мин, центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

7.2.2.5 Перенесите в соответствующие промаркированные пробирки для неизвестных образцов надосадочную жидкость. Для пробирки «К-» переносить надосадочную жидкость не требуется.

- 7.2.2.6 Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
- 7.2.2.7 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 15 мин.
- 7.2.2.8 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.2.9 Добавьте к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и аккуратно переверните пробирки 3-5 раз.
- 7.2.2.10 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 5 мин.
- 7.2.2.11 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.2.12 Добавьте к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и аккуратно переверните пробирки 3-5 раз.
- 7.2.2.13 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 5 мин.
- 7.2.2.14 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.2.15 Откройте пробирки и высушите осадок при 65 °C в течение 5 мин.
- 7.2.2.16 Добавьте к осадку по 50 мкл буфера для растворения, закройте пробирки.
- 7.2.2.17 Осадите капли центрифугированием пробирок на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
- 7.2.2.18 Термостатируйте пробирки при 65 °C в течение 10 мин. Встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.
- 7.2.2.19 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 30 с.

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

Препарат ДНК можно хранить при температуре от минус 22 °C до минус 18 °C не более одного месяца или при температуре от минус 72 °C до минус 68 °C не более одного года.

Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР после хранения необходимо разморозить препарат ДНК и отрицательный контрольный образец при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) или при температуре от 2 °C до 8 °C, затем 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.

ВНИМАНИЕ! Для препарата ДНК допускается только однократное размораживание!

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

- 7.2.3 Выделение ДНК из биоптатов/пунктатов с использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо включить термостат для прогревания до 50 °C.

- 7.2.3.1 Промаркируйте по одной одноразовой пластиковой пробирке объемом 1,5 мл для каждого неизвестного образца и отрицательного контрольного образца (К-).
- 7.2.3.2 Добавьте в пробирки с подготовленными образцами биоптатов/пунктатов (см.6.5.2) и в пробирку «К-» по 150 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирок.
- 7.2.3.3 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», 50 мкл стерильного физиологического раствора или транспортной среды. Плотнo закройте пробирки, встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3-5 с.
- 7.2.3.4 Термостатируйте пробирки при 50 °С в течение 30 мин, центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3-5 с.
- 7.2.3.5 Перенесите в соответствующие промаркированные пробирки для неизвестных образцов надосадочную жидкость. Для пробирки «К-» переносить надосадочную жидкость не требуется.
- 7.2.3.6 Тщательно ресуспендируйте сорбент на микроцентрифуге-вортeксе. Перевернув пробирку вверх дном, убедитесь, что сорбент не залип на дно пробирки. При необходимости повторите перемешивание сорбента.
- 7.2.3.7 Добавьте во все пробирки (включая «К-») по 20 мкл предварительно ресуспендированного сорбента, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3-5 с.
- 7.2.3.8 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты.
- 7.2.3.9 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.3.10 Добавьте к осадку по 200 мкл промывочного раствора №1, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3-5 с.
- 7.2.3.11 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты.
- 7.2.3.12 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.3.13 Добавьте к осадку по 200 мкл промывочного раствора №2, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3-5 с.
- 7.2.3.14 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты.
- 7.2.3.15 Добавьте к осадку по 200 мкл промывочного раствора №3, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортeксе в течение 3-5 с.
- 7.2.3.16 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты.
- 7.2.3.17 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 7.2.3.18 Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 50 °С в течение 5 мин.
- 7.2.3.19 Добавьте к осадку по 100 мкл элюирующего раствора, не касаясь края пробирки, закройте пробирки и встряхните пробирки на микроцентрифуге-вортeксе в течение 5-10 с.

7.2.3.20 Термостатируйте пробирки при 50 °С в течение 5 мин.

7.2.3.21 Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре от 2 °С до 8 °С. Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо повторить 7.2.3.20 - 7.2.3.21.

Если образец предполагается хранить более 7 суток, перенесите надосадочную жидкость в отдельную одноразовую пробирку.

Более 7 суток препарат ДНК следует хранить при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С.

Срок хранения препарата ДНК при температуре от минус 22 °С до минус 18 °С - не более 6 месяцев.

В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР после хранения необходимо разморозить препарат ДНК и отрицательный контрольный образец при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) или при температуре от 2 °С до 8 °С, затем 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.

ВНИМАНИЕ! Для препарата ДНК допускается только однократное размораживание!

Препарат ДНК готов к внесению в реакционную смесь для ПЦР.

7.3 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!

7.3.1 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.

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

7.3.3 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!

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

7.3.5 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 внесением в пробирки с реакционной смесью 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 (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки) встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК 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. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

- 7.3.6 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.
- 7.3.7 Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. 7.1).
- 7.3.8 Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.3.9 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).
- 7.3.10 Установите все пробирки/стрипы в детектирующий амплификатор.
- 7.3.11 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 положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.
- 7.3.12 Для детектирующих амплификаторов Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:
Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 4, 5, 6 соответственно.

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» (фасовка S)

№ 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 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 4 – 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 5 – 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	0:15	50
4	64 ✓	0:20	

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

Таблица 6 – 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	0:20	50
	2	64 ✓	0:20	

✓ - сбор данных для необходимых флуорофоров (Fam, Vic (Hex)) включен

7.4 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка U, ручное дозирование

ВНИМАНИЕ!

- Для амплификации следует использовать одноразовые амплификационные пробирки объемом 0,2 мл или микропланшеты ПЦР 96 лунок¹, герметизируемые термопленкой. Не рекомендуется использовать стрипованные пробирки в связи с опасностью постаmplификационной контаминации.
- При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

¹ - для детектирующих амплификаторов «ДТлайт» и Rotor-Gene Q микропланшеты 96 лунок не используются

- 7.4.1 Промаркируйте необходимое количество одноразовых амплификационных пробирок объёмом 0,2 мл или микропланшет ПЦР 96 лунок для неизвестных образцов, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

Примечание – Рекомендуются 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/ зарезервировать 4 лунки микропланшета для неизвестных образцов, одну пробирку/лунку для «К-» и одну пробирку/лунку для «К+». Общее количество пробирок/лунок – 6.

- 7.4.2 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
- 7.4.3 Внесите во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета (включая «К-» и «К+») по 6,0 мкл смеси для амплификации.
- 7.4.4 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.

- 7.4.5 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/количество необходимых лунок микропланшета с учётом «К-» и «К+».

Пример:

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

- 7.4.6 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.

- 7.4.7 Добавьте во все промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета со смесью для амплификации по 6,0 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq МАХ. Неплотно прикройте пробирки.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТаq МАХ в пробирки/лунки со смесью для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить 7.4.8 - 7.4.14.

7.4.8 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. Перед внесением в пробирки/лунки с реакционной смесью 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 (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки) встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с

3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-МЧ МАКС необходимо не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК 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. Закрывайте пробирки плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.4.9 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки/необходимые лунки микропланшета по 6,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки/лунки, промаркированные «К-» и «К+», ДНК не вносится.

7.4.10 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К-», 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.7.1).

7.4.11 Внесите в пробирку/лунку, промаркированную «К+», 6,0 мкл положительного контрольного образца.

7.4.12 В случае использования микропланшетов ПЦР 96 лунок:

7.4.12.1 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак.

7.4.12.2 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.

7.4.12.3 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.

7.4.13 В случае использования пробирок:

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

7.4.14 Установите все пробирки/микропланшет ПЦР в детектирующий амплификатор и проведите ПЦР (7.4.15, 7.4.16).

7.4.15 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 образцов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

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

Проведите ПЦР с учетом объёма реакционной смеси, равного 18 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 5, 6, 8 соответственно.

Таблица 7 – 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 ²	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

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

² - допускается хранение при температуре 10 °C

Таблица 8 – 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			

7.5 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).

- 7.5.1 Встряхните пробирку со смесью для амплификации на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
- 7.5.2 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.

- 7.5.3 Следуя указаниям ПО дозирующего устройства ДТстрим, приготовьте в отдельной одноразовой пробирке смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq МАХ.
- 7.5.4 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.
- 7.5.5 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 (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки) встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с
 3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК 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.
-
- 7.5.6 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 для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.
 - 7.5.7 Поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет ПЦР в подложку устройства для запечатывания планшетов ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
 - 7.5.8 Проведите запечатывание микропланшета ПЦР полимерной термоплёнкой согласно руководству по эксплуатации прибора ДТпак.
 - 7.5.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР при RCF(g) 100 в течение 30 с.
 - 7.5.10 Установите микропланшет ПЦР в блок детектирующего амплификатора.
 - 7.5.11 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 и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 7.

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится детектирующим амплификатором автоматически во время амплификации.

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

Таблица 9 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции		Интерпретация результата
Fam/Green (искомая ДНК), Cp/Cq/Ct	Hex/Yellow/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы		
Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>Toxoplasma gondii</i>
Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Toxoplasma gondii</i>
Не указан	Не указан	Недостовверный 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 МАХ, в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ 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 °С до 8 °С 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 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 следует хранить в защищённом от света месте.

10.2.2.2 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.

10.2.3 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 приемка 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 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 Тохорlasma gondii 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	Cy 5	Cy 5.5
<i>Toxoplasma gondii</i>	ВК	-	-	-

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 Тохорlasma gondii 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	Cy 5	Cy 5.5
<i>Toxoplasma gondii</i>	ВК	-	-	-

¹ - допускается хранение при температуре 10 °C



175-9 2024-08-06



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления, типирования и количественного определения
вируса папилломы человека методом ПЦР

HPV КВАНТ

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2010/08811 от 02 августа 2024 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 НАЗНАЧЕНИЕ	8
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	9
2.1 Состав набора	9
2.2 Число анализируемых проб биологического материала	10
2.3 Принцип действия	11
2.4 Время проведения анализа	12
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	13
3.1 Аналитическая специфичность анализа	13
3.2 Предел обнаружения	13
3.3 Диагностические характеристики	13
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	14
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	16
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	17
6.1 Материалы для исследования	17
6.2 Взятие образцов соскобов эпителиальных клеток	17
6.3 Транспортировка и хранение исследуемых образцов	20
6.4 Подготовка (клинического) материала для исследования	20
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	21
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	21
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	21
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А	24
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	29
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР	29
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	31
10.1 Транспортирование	31
10.2 Хранение	31
10.3 Указания по эксплуатации	31
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	32
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	32
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	32
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА	32
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	33
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	34

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ВПЧ	- вирус папилломы человека
ВОЗ	- Всемирная Организация Здравоохранения
CIN	- Cervical Intraepithelial Neoplasia
AIN	- Anal Intraepithelial Neoplasia
РШМ	- рак шейки матки
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ЛИС	- лабораторная информационная система
ИВ	- интерферирующие вещества
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ВК	- внутренний контроль
К+	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контрольный образец

ВВЕДЕНИЕ

Папилломавирусная инфекция уrogenитального тракта – одна из наиболее часто встречающихся инфекций, передающихся преимущественно половым путем, возбудителем которой является вирус папилломы человека (ВПЧ). Известно более 100 типов ВПЧ, подробно описано около 80, из них более 30 поражают эпителий уrogenитального тракта, где наиболее чувствительна зона трансформации шейки матки и аногенитальной области. Вирус обладает тропностью к эпителиальным клеткам человека (наиболее чувствительна зона трансформации шейки матки), может вызывать доброкачественную пролиферацию тканей, а может быть причиной неопластической трансформации эпителия – предракового состояния и, соответственно, развития рака. По способности вызывать злокачественное перерождение эпителия, папилломавирусы делят на две группы – высокого (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 типы) и низкого (6, 11, 36, 42, 43, 44, 46, 47, 50 типы) онкогенного риска. Низкоонкогенные типы ассоциированы с доброкачественной пролиферации кожи и слизистых уrogenитальной, анальной областей, ротовой полости, гортани, проявляясь в виде генитальных и венерических бородавок, остроконечных и экзофитных кондилом. Высокоонкогенные типы ассоциированы с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями, наиболее эпидемиологически значимыми являются неопластическая трансформация шейки матки (CIN) и анальной области (AIN). Плоскоклеточному анальному раку, также, как и раку шейки матки, предшествуют предраковые поражения эпителиальной ткани. Наличие у женщин генитальных неоплазий повышает риск развития анального рака. В последние годы заболеваемость раком прямой кишки и ануса увеличивается на 1,7% в год, составляя 19,79 случаев на 100 тыс. населения, смертность – 11,56 случаев на 100 тыс. населения. На сегодняшний день доказана связь между персистенцией ВПЧ высокого онкогенного риска и развитием рака шейки матки. Заболеваемость РШМ не имеет тенденции к снижению, оставаясь на высоком уровне (21,27 случаев на 100 тыс. населения), в 8,44 случаях на 100 тыс. населения являясь причиной летального исхода [1; 3; 5; 7].

Рак шейки матки – одно из немногих злокачественных заболеваний с установленным этиологическим фактором. Высокоонкогенный ВПЧ может длительно персистировать в организме женщины, не вызывая РШМ, поэтому одного инфицирования эпителиальных клеток ВПЧ не достаточно для развития ракового перерождения. Возможно длительное, в течение десятилетий, латентное течение папилломавирусной инфекции, без клинических проявлений, характеризующееся бессимптомным ВПЧ-носительством, выявляемое только с помощью молекулярно-биологических методов. В возрасте до 30 лет, в 80% случаев вирус может самопроизвольно элиминироваться из организма в течение 24 месяцев и не иметь клинического значения. После 35 лет ВПЧ персистирует более продолжительное время. Скорость элиминации ВПЧ зависит от иммунореактивности клеток организма хозяина. Таким образом, выявление ВПЧ может являться фактором риска развития неопластической трансформации в будущем, а может быть маркером высокой вероятности наличия неопластической трансформации в данный момент [2; 4; 9].

Диагноз РШМ устанавливается на основании специфичных изменений в клеточных структурах, выявленных цитологическим методом. Однако по ряду объективных причин (высокая стоимость, нехватка врачей-цитологов в РФ и др.) метод не может быть широко внедрен в рутинную практику. Поэтому цитологическое исследование целесообразно использовать в качестве подтверждающего теста при проведении скрининга с использованием молекулярно-генетических методов, в т. ч. ПЦР. Выявление ВПЧ с помощью метода ПЦР позволяет отнести вирус-позитивных женщин к группе высокого риска развития неоплазии. Такие пациентки нуждаются в цитологическом обследовании для выбора тактики дальнейшего наблюдения и, при необходимости, лечения. ВПЧ-отрицательные пациентки могут не подвергаться цитологическому скринингу, т.е. применение молекулярно-генетических методов исследования позволяет заменить популяционный цитологический скрининг на скрининг в группе риска. Во избежание гипердиагностики и полипрагмазии скрининговые исследования с использованием молекулярно-генетических методов должны начинаться с 30-летнего возраста и проводиться с интервалом в 5 лет [2; 6; 8].

У мужчин ВПЧ-инфекция может вызывать нарушение показателей подвижности и фрагментацию ДНК в сперматозоидах [10]. В 2016 году была опубликована новая классификация ВОЗ рака полового члена. В этой классификации плоскоклеточные карциномы полового члена подразделяются на опухоли, связанные и не связанные с ВПЧ [11]. Генотипы высокого риска, такие как 16, 18, 31, 33, 45, 52 и 58, среди прочего, преимущественно инфицируют участки слизистой оболочки и связаны с развитием некоторых видов рака полового члена и анального канала у мужчин [12]. По данным метаанализа из 4199 случаев рака полового члена около половины случаев были связаны с ВПЧ-инфекцией [13] и ВПЧ-тестирование и экспрессии p16 имеют прогностическое значение в некоторых случаях, ВПЧ-ассоциированного рака у мужчин [14].

Присутствие вируса ВПЧ в сперме наблюдается у мужчин с воспалительными заболеваниями предстательной железы [15]. Также показана роль ВПЧ-инфекции в развитии рака предстательной железы [16,17,18]. Обнаружение у мужчин ВПЧ-16 служит маркером повышенного риска развития этого вида рака [18].

Вирус папилломы человека также может обнаруживаться в моче при воспалительных заболеваниях мочеполовой системы у женщин и мужчин [19,20], при онкопатологии шейки матки у женщин [21] и раке предстательной железы у мужчин [19].

Список литературы

1. Гинекология: национальное руководство / Под ред. В.И. Кулакова, Г.М. Савельевой, И.Б. Манухина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 1088 с.
2. Заболевания шейки матки и генитальные инфекции / Под ред. Проф. В.Н. Прилепской. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 384 с.
3. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. – 250 с.
4. Профилактика рака шейки матки: руководство для врачей / Под ред. акад. РАМН Г.Т. Сухих, проф. В.Н. Прилепской. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: МЕДпресс-информ, 2012. – 192 с.
5. Совершенствование методов диагностики и лечения предраковых заболеваний аногенитальной области, обусловленных ВПЧ-инфекцией: автореферат дис. кандидата медицинских наук: 14.01.01 / Л. А. Суламанидзе. – М., 2016. – 25 с.
6. Цитологический скрининг рака шейки матки [Текст]: методические рекомендации / С.Л. Воробьев, Т.М. Иванова, И.Н. Костючек, В.И. Новик, Е.Н. Славнова, В.П. Трошин, И.П. Шабалова. – Смоленск, 2013. – 15 с.
7. Anal human papillomavirus infection and abnormal anal cytology in women with genital neoplasia / I.U. Park, J.W. Ogilvie, K.E. Anderson, Zhong-ze Li, L. Darrah, R. Madoff, L. Downs // Gynecol Oncol. – 2009. – Vol. 114 (3). – P. 399–403.
8. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials / G. Ronco, J. Dillner, K.M. Elfstrom, S. Tunesi, P.J. Snijders, M. Arbyn, H. Kitchener, N. Segnan, C. Gilham, P. Giorgi-Rossi, J. Berkhof, J. Peto, C.J. Meijer // Lancet. – 2014. – Vol. 383. – № 9916. – P. 524–532.
9. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial / G. Ronco, P. Giorgi-Rossi, F. Carozzi, M. Confortini, P. Dalla Palma, A. Del Mistro, B. Ghiringhello, S. Girlando, A. Gillio-Tos, L. De Marco, C. Naldoni, P. Pierotti, R. Rizzolo, P. Schincaglia, M. Zorzi, M. Zappa, N. Segnan, J. Cuzick // The Lancet. Oncology. – 2010. – Vol. 11. – № 3. – P. 249–257.
10. Boeri L, Capogrosso P, Ventimiglia E et al. High-risk human papillomavirus in semen is associated with poor sperm progressive motility and a high sperm DNA fragmentation index in infertile men. Hum Reprod. 2019 Feb 1; 34(2):209–217.
11. Moch H, Cubilla A.L, Humphrey PA, et al. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part a: renal, penile, and testicular tumours. Eur Urol 2016; 70: 93–105.
12. Parkin D.M., Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. Vaccine, 2006, V 24, Supplement 3, Pages S11–S25.

13. Olesen T.B., Sand F.L., Rasmussen C.L. et al. Prevalence of human papillomavirus DNA and p16INK4a in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2019; 20: 145–58.
14. Sand FL, Rasmussen CL, Frederiksen MH et al. Prognostic Significance of HPV and p16 Status in Men Diagnosed with Penile Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 2018, 27(10); 1123–32.
15. La Vignera S., Condorelli R.A., Cannarella R. et al. High rate of detection of ultrasound signs of prostatitis in patients with HPV-DNA persistence on semen: role of ultrasound in HPV-related male accessory gland infection. *J Endocrinol Invest*. 2019 Dec; 42(12):1459–1465. doi: 10.1007/s40618-019-01069-8.
16. Yin B., Liu W., Yu P. et al. Association between human papillomavirus and prostate cancer: A meta-analysis. *Oncol Lett*. 2017 Aug; 14(2):1855–1865. doi: 10.3892/ol.2017.6367.
17. Moghooei M., Keshavarz M., Ghorbani S. et al. Association between human papillomavirus infection and prostate cancer: A global systematic review and meta-analysis. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2019 Oct; 15(5):e59–e67. doi: 10.1111/ajco.13124.
18. Russo G.I., Calogero A.E., Condorelli R.A. et al. Human papillomavirus and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Aging Male*. 2018 Mar 23:1–7. doi: 10.1080/13685538.2018.1455178.
19. Nakashima K, Shigehara K, Kitamura T. et al. Risk factors for human papillomavirus detection in urine samples of heterosexual men visiting urological clinics in Japan. *J Infect Chemother*. 2018 Sep; 24(9):713–717. doi: 10.1016/j.jiac.2018.04.011.
20. Javanmard B., Barghi M.R., Amani D., Fallah Karkan M, Mazloomfard M.M. Human Papilloma Virus DNA in Tumor Tissue and Urine in Different Stage of Bladder Cancer. *Urol J*. 2019 Aug 18; 16(4):352–356. doi: 10.22037/uj.v0i0.4181.
21. Pattyn J., Van Keer S., Biesmans S. et al. Human papillomavirus detection in urine: Effect of a first-void urine collection device and timing of collection. *J Virol Methods*. 2019 Feb; 264:23–30. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.11.008.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для выявления, типирования и количественного определения вируса папилломы человека методом ПЦР (HPV КВАНТ), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Набор реагентов предназначен для выявления, типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 в биологическом материале человека (соскобы эпителиальных клеток, секрет простаты, эякулят, моча, биоптат) методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени.

1.3 Функциональное назначение медицинского изделия: Изделие предназначено для диагностики *in vitro* (выявления, типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 в биологическом материале человека).

1.4 Показания к проведению исследования: профилактический ВПЧ-скрининг предрака и рака шейки матки, диспансерный мониторинг пациентов с ВПЧ-инфекцией, диагностика ВПЧ-инфекции при онкопатологии шейки матки, полового члена, предстательной железы, ануса, гортани, воспалительных заболеваниях мочеполовой системы у женщин и мужчин.

1.5 Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.

1.6 Набор может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

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

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов выпускается в следующих вариантах исполнения и фасовки:

- HPV квант-21, фасовка S;
- HPV квант-21, фасовка A;
- HPV квант-15, фасовка S;
- HPV квант-4, фасовка S.

Варианты исполнения различаются количеством показателей определяемых набором реагентов:

- HPV квант-21 – предназначен для выявления, типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 генотипов;
- HPV квант-15 – предназначен для выявления, группового типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 генотипов;
- HPV квант-4 – предназначен для выявления, типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18 генотипов.

2.1 Состав набора

2.1.1 HPV квант-21

REF R1-P317-XA/4, фасовка A			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смеси для амплификации Стрим	Прозрачная голубая или светло-розовая жидкость	2 стрипа по 8 пробирок	по 120 мкл
ПЦР-буфер Стрим-К	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 600 мкл
Полимераза ТехноТaq МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2 пробирки	по 60 мкл
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 100 мкл
Стрипы по 8 пробирок	10 шт.		

REF R1-P317-S3/5, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под воскообразным белым слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы МАХ	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	160 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

2.1.2 HPV квант-15

REF R1-P316-S3/4, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под воскообразным белым слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы MAX	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	160 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

2.1.3 HPV квант-4

REF R1-P315-S3/4, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации HPV 6, 11, запечатанная парафином	Прозрачная голубая жидкость, под воскообразным белым слоем	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Смесь для амплификации HPV 16, 18, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость, под воскообразным голубым слоем	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Смесь для амплификации KBM, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость, под воскообразным белым слоем	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	3 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	3 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	160 мкл
Крышки для стрипов	18 шт.		

2.2 Число анализируемых проб биологического материала

Набор реагентов предназначен для одноразового применения и рассчитан:

- в варианте исполнения HPV квант-21:
 - в фасовке А, на 48 определений, включая исследования положительных и отрицательных контрольных образцов.
 - в фасовке S, на 24 определения, включая исследования положительных и отрицательных контрольных образцов.
- в варианте исполнения HPV квант-15 (фасовка S) на 48 определений, включая исследования положительных и отрицательных контрольных образцов.
- в варианте исполнения HPV квант-4 (фасовка S) на 48 определений, включая исследования положительных и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип действия

Метод: Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный и количественный мультиплексный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается для стандартной фасовки набора реагентов методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина, для автоматизированной фасовки – модификацией полимеразы ТехноTaq MAX. Используемый подход исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В смеси для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт 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) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В наборе, в состав смесей для амплификации добавлен внутренний контроль, предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

Одна из смесей предназначена для амплификации геномной ДНК человека и используется для контроля взятия клинического материала и нормирования количества ДНК HPV на количество клеток человека в данном образце.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации, включены флуоресцентные метки Fam, Rox и Cy5. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации внутреннего контроля (ВК), входит флуоресцентный краситель Hex (таблица 1).

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В определенные пробирки набора в вариантах исполнения HPV квант-21 и HPV квант-15 добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором как маркер определения положения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора. После прохождения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом несоответствии.

Исследование с использованием набора реагентов HPV КВАНТ состоит из этапов выделения ДНК (пробоподготовка) и проведения ПЦР в режиме реального времени.

Для проведения ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени используют детектирующие амплификаторы (ООО «НПО ДНК-Технология»): ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96 со специальным программным обеспечением.

Таблица 1 – Перечень показателей, выявляемых набором, каналы детекции продуктов амплификации и цветовая кодировка

HPV квант-21					
№ пробирки в стрипе	Каналы детекции				Цвет смеси / парафина*
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1	HPV 31	BK	HPV 35	HPV 16	Голубой / Белый
2	HPV 52	BK	HPV 33	HPV 68	Бесцветный или светло-розовый**/ Белый
3	HPV 45	BK	HPV 82	HPV 51	
4	HPV 6	BK	HPV 44	HPV 11	
5	HPV 18	BK	HPV 39	HPV 58	
6	HPV 66	BK	HPV 26	HPV 53	
7	HPV 59	BK	HPV 56	HPV 73	
8	KBM	BK	маркер	отсутствует	
* – парафин присутствует только в пробирках со смесью для амплификации фасовки S					
** – для наборов в фасовке А					
HPV квант-15					
№ пробирки в стрипе	Каналы детекции				Цвет смеси / парафина
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1, 5	HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58	BK	отсутствует	HPV 56	Голубой / Белый
2, 6	HPV 18, 39, 45, 59	BK	отсутствует	HPV 6, 11	Бесцветный / Белый
3, 7	HPV 51	BK	маркер	HPV 68	
4, 8	KBM	BK	отсутствует	отсутствует	
HPV квант-4					
Смесь для амплификации	Каналы детекции				Цвет смеси / парафина
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
HPV 6,11	HPV 6	BK	отсутствует	HPV 11	Голубой / Белый
HPV 16,18	HPV 18	BK	отсутствует	HPV 16	Бесцветный / Голубой
KBM	KBM	BK	отсутствует	отсутствует	Бесцветный / Белый

2.4 Время проведения анализа (с учётом пробоподготовки) – от 2,5 часов.

¹ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2

² – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Аналитическая специфичность анализа

В образцах исследуемого материала, содержащих ДНК выявляемого генотипа HPV, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительные результаты для специфических продуктов по заявленным каналам детекции.

В образцах исследуемого материала, не содержащих ДНК выявляемого генотипа HPV, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует отрицательные результаты для специфических продуктов по заявленным каналам детекции.

В образцах исследуемого материала, в котором присутствует геномная ДНК человека, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительный результат в соответствующей пробирке.

В образцах биологического материала, в котором отсутствует геномная ДНК человека, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует отрицательный результат в соответствующей пробирке.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК следующих бактерий и вирусов: *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp., EBV, HHV6, HHV8, HSV1, HSV2, VZV.

3.2 Предел обнаружения

Предел обнаружения для генотипов HPV составляет 5 копий ДНК на амплификационную пробирку (10^3 копий/мл препарата ДНК). Предел обнаружения установлен путем анализа серийных разведений лабораторных контрольных образцов (ЛКО).

Предел обнаружения зависит от вида биоматериала, используемого комплекта/набора реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения) выделенной ДНК.

Пример: Предел обнаружения для набора составляет 600 копий/образец при выделении ДНК из образца комплектами/наборами ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ (объем элюции 300 мкл).

3.3 Диагностические характеристики

Количество образцов (n) – 191;

Диагностическая чувствительность составляет (95% ДИ) – 99,3% (96,7–100%);

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ) – 99,9% (99,8–99,9%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

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

При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька (неопудренные).

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

Этап ПЦР в реальном времени следует проводить в помещении, снабженном комплектами полуавтоматических или автоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

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

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

ВНИМАНИЕ! Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации.

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.

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями 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	Вариант исполнения		
	HPV квант-21	HPV квант-15	HPV квант-4
Фасовка А			
Смеси для амплификации Стрим	Нет опасных веществ	–	–
ПЦР-буфер Стрим-К	Нет опасных веществ	–	–
Полимераза ТехноТaq МАХ	Нет опасных веществ	–	–
Буфер для разведения ДНК	Нет опасных веществ	–	–
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	–	–
Фасовка S			
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	–
Смесь для амплификации HPV 6, 11, запечатанная парафином	–	–	Нет опасных веществ
Смесь для амплификации HPV 16, 18, запечатанная парафином	–	–	Нет опасных веществ
Смесь для амплификации KBM, запечатанная парафином	–	–	Нет опасных веществ
Раствор Taq-полимеразы МАХ	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	–
Раствор Taq-полимеразы	–	–	Нет опасных веществ
Минеральное масло	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	Азид натрия менее 0,1%	Азид натрия менее 0,1%

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

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

Не допускается использовать набор реагентов:

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

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 HPV КВАНТ требуется следующее оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Вариант фасовки	
	S	A
ПЦР-бокс	да	да
амплификатор детектирующий	да	да
дозирующее устройство ДТстрим	нет	да
герметизирующее устройство ДТпак	нет	да
холодильник или холодильная камера	да	да
морозильная камера	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да
центрифуга для микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл	да	нет
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 20 до 200 мкл	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом от 1,0 до 20 мкл, от 1,0 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл	да	нет
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом от 1,0 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл	да	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да
полимерная термопленка для запаивания микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да

Приборное обеспечение

Для проведения ПЦР используют амплификаторы детектирующие: ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.3.5.84; файл с параметрами анализа.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материалы для исследования

В качестве биологического материала используют биологический материал человека: соскобы эпителиальных клеток, секрет простаты, эякулят, моча, биоптат.

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

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.

Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см. пп.2.3, 9.5).

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

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

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

6.2 Взятие образцов соскобов эпителиальных клеток

Взятие соскобов проводится стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований.

6.2.1 Общие требования

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

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

6.2.2 Материал для исследований

Решение о выборе места взятия материала для исследования на наличие вируса папилломы человека принимает лечащий врач на основании совокупности жалоб пациента и клинической картины.

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. Неправильное взятие может привести к невозможности получения достоверного результата и, вследствие этого, необходимости повторного взятия биоматериала.

6.2.3 Особенности взятия материала из уретры:

- соскоб выполняют стерильным одноразовым зондом;
- 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;
- в уретру зонд вводится на глубину 1,0–1,5 см, затем осторожными вращательными движениями продвигается к наружному отверстию уретры.

6.2.4 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.

6.2.5 Особенности взятия материала из влагалища с использованием устройства для самостоятельного забора проб.

- Взятие материала проводят в соответствии с инструкцией к устройству.

6.2.6 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 исключить его касание стенок влагалища.

6.2.7 Особенности взятия материала с шейки матки:

- материал берётся до проведения мануального исследования;
- перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь, воспалительный экссудат или кровь (если они есть);

- далее необходимо аккуратно соскоблить эксфолиативный клеточный материал и поверхностный эпителий из влагалищной порции шейки матки, области зоны трансформации и/или цервикального канала, если соединение многослойного плоского и призматического эпителия смещено в цервикальный канал.

6.2.8 Порядок взятия соскобного материала в пробирку с транспортной средой:

- откройте крышку пробирки;
- с помощью одноразового зонда сделайте соскоб эпителиальных клеток из соответствующего биотопа (влагалище, уретра, цервикальный канал, анальное отверстие, ротоглотка);
- перенесите зонд с биоматериалом в пробирку с транспортной средой и тщательно прополощите его, избегая разбрызгивания жидкости;
- извлеките зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и удалите избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизируйте;
- плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте.

6.2.9 Особенности получения секрета предстательной железы

- перед взятием секрета простаты рекомендуется половое воздержание в течение трех суток до исследования;
- непосредственно 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. После окончания массажа выделившийся простатический секрет в виде свободно стекающей капли (0,15–1,0 мл) собирают в одноразовую сухую стерильную пробирку объёмом 2 мл или контейнер объёмом до 60 мл;
- ёмкость с секретом простаты герметично закрывают крышкой и маркируют.

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

6.2.10 Особенности получения эякулята

- перед сбором 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 и собирают в стерильный контейнер объёмом до 60 мл;
- ёмкость с эякулятом герметично закрывают крышкой и маркируют.

6.2.11 Моча

- для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20–30 мл. Отбор мочи проводят в специальную сухую стерильный ёмкость объёмом до 60 мл, снабжённую герметично закрывающейся крышкой
- после сбора мочи контейнер плотно закрывают и маркируют

6.2.12 Биопсийный материал

- биопсийный материал (биоптат) помещают в стерильную пробирку со стерильным физраствором или водой (не более 0,5 мл) или в пустую стерильную пробирку;
- ёмкость с биоптатом герметично закрывают крышкой и маркируют.

6.3 Транспортировка и хранение исследуемых образцов

Образцы до начала исследования хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов¹. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Замороженный материал хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

6.4 Подготовка (клинического) материала для исследования

6.4.1 Подготовка материала из влагиалища, взятого с использованием устройства для самостоятельного забора проб:

- добавьте в пробирку (или другую ёмкость, указанную в инструкции к устройству для самостоятельного забора проб (далее «пробирка»)), в которой находится наконечник устройства, 500 мкл физиологического раствора, закройте пробирку;
- встряхните пробирку в течение 15 с на микроцентрифуге-вортексе;
- инкубируйте пробирку в течение 3–5 минут при комнатной температуре;
- центрифугируйте пробирку в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе;
- извлеките наконечник устройства из пробирки и выбросьте;
- перенесите содержимое пробирки в чистую пробирку объёмом 1,5 мл;
- центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000–16000 в течение 10 мин;
- удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

6.4.2 Подготовка мочи

- перенесите 1,0 мл материала из контейнера в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл;
- центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000–16000 в течение 10 мин;
- наиболее полно удалите надосадочную жидкость;
- добавьте к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного;
- центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000–6000 в течение 10 мин;
- удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

¹ – при использовании транспортной среды срок хранения образцов устанавливается в соответствии с инструкцией к используемой транспортной среде

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Контроль качества выделенной ДНК осуществляется в ходе ПЦР с помощью системы внутреннего контроля (ВК).

Для выделения ДНК рекомендуется использовать комплекты/наборы реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ-РАПИД (ООО «НПО ДНК-Технология», ООО «ДНК-Технология ТС», Россия) или другие комплекты/наборы реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия и предназначенные для выделения ДНК из соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования методом ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта/набора для выделения ДНК из биологического материала одновременно необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор, в объеме, указанном в инструкции к комплекту/набору реагентов для выделения ДНК.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

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

7.2.1 HPV квант-4

7.2.1.1 Промаркируйте по одной пробирке из стрипов со смесями для амплификации, запечатанными парафином (HPV 6,11; HPV 16,18; KBM) для каждого анализируемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Примечание – Для HPV квант-4 один стрип рассчитан на исследование восьми образцов.

Пример:

Необходимо проанализировать два образца. Для этого нужно промаркировать 12 пробирок в трех стрипах – шесть для исследуемых образцов и по три для «К-» и «К+».

7.2.1.2 Далее выполните пункты 7.2.4 – 7.2.11.

7.2.2 HPV квант-15

7.2.2.1 Промаркируйте стрипы с запечатанными парафином смесями для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Примечание – Для HPV квант-15 один стрип рассчитан на исследование двух образцов.

Пример:

Необходимо проанализировать два образца. Для этого нужно промаркировать два стрипа – один для исследуемых образцов, один для «К-» и «К+».

7.2.2.2 Далее выполните пункты 7.2.4 – 7.2.11.

7.2.3 HPV квант-21

7.2.3.1 Промаркируйте по одному стрипу с запечатанными парафином смесями для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Примечание – Для HPV квант-21 один стрип рассчитан на исследование одного образца.

Пример:

Необходимо проанализировать два образца. Для этого нужно промаркировать 4 стрипа – два для исследуемых образцов, один для «К-» и один для «К+».

7.2.3.2 Далее выполните пункты 7.2.4 – 7.2.11.

7.2.4 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы (для HPV квант-15 и HPV квант-21 – с раствором Таq-полимеразы МАХ) в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.5 Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы (для HPV квант-15 и HPV квант-21 – раствора Таq-полимеразы МАХ).

7.2.6 Добавьте в каждую пробирку по одной капле минерального масла (около 20 мкл). Закройте крышки стрипов.

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

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС-ПЛЮС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при RCF(g) 12000–16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

3. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.8 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки стрипа, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК. В пробирки «К-», «К+» ДНК не вносится.

- 7.2.9 Внесите в стрипованные пробирки, промаркированные «К–», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. п.7.1).
- 7.2.10 Внесите в стрипованные пробирки, промаркированные «К+», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.2.11 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.2.12 Установите стрипы в блок детектирующего амплификатора.
- 7.2.13 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». Загрузите соответствующий файл. Добавьте в протокол соответствующие тесты, укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. п.7.2.12) и проведите ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Программа амплификации для теста «HPV квант-15» отличается от программы амплификации для тестов «HPV квант-4» и «HPV квант-21». Не допускается использование тестов «HPV квант-15» и «HPV квант-4», «HPV квант-21» для одной постановки.

- 7.2.14 При выборе тестов «HPV квант-4» и «HPV квант-21» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 2. При выборе теста «HPV квант-15» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

Таблица 2 – Программа амплификации для тестов «HPV квант-4» и «HPV квант-21»

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

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

Таблица 3 – Программа амплификации для теста «HPV квант-15»

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	30	1		Цикл
	94,0	1	30			
2	94,0	0	30	5		Цикл
	60,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		Цикл
	60,0	0	15		√	
4	94,0	0	5	1		Цикл
5	10,0 ¹	...	...	Хранение		Хранение

Тесты (файлы) для приборов ДТпрайм, ДТлайт и ДТ-96 предоставляются производителем набора реагентов.

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А

7.3.1 HPV квант-21 (вариант с предварительной подготовкой реагентов ручным дозированием – «Базовый способ постановки»)

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

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

7.3.1.2 Приготовьте смесь ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТaq МАХ. Внесите в пробирку с ПЦР-буфером Стрим-К весь объём одной пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ, т.е. 600 мкл ПЦР-буфера Стрим-К плюс 60 мкл полимеразы ТехноТaq МАХ:

- при проведении 48 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки») необходимо использовать две пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К и две пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ;
- при проведении 24 определений одновременно (вариант постановки «Половина микроплшета 384 лунки») необходимо использовать одну пробирку с ПЦР-буфером Стрим-К и одну пробирку с полимеразой ТехноТaq МАХ.

7.3.1.3 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТaq МАХ в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

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

- 7.3.1.4 Аккуратно, без образования воздушных пузырей, внесите в восемь пробирок пустого стрипа по 140 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТaq МАХ при постановке 48 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки»), или по 75 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТaq МАХ при постановке 24 определений одновременно (вариант постановки «Половина микропланшета 384 лунки»).
- 7.3.1.5 Центрифугируйте стрип в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.3.1.6 Промаркируйте шесть пустых стрипов, из состава набора, при постановке 48 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки»), или три пустых стрипа при постановке 24 определения одновременно (вариант постановки «Половина микропланшета 384 лунки»).
- 7.3.1.7 Встряхните пробирки с буфером для разведения ДНК в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.3.1.8 Внесите в каждую пробирку промаркированных стрипов по 60 мкл буфера для разведения ДНК.
- 7.3.1.9 Встряхните пробирки с полученными препаратами ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС-ПЛЮС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при RCF(g) 12000–16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
 2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.3.1.10 Аккуратно, без образования воздушных пузырей, внесите в соответствующие пробирки стрипов с буфером для разведения ДНК по 24 мкл препарата ДНК исследуемых образцов, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

ВНИМАНИЕ! Во избежание контаминации рекомендуется вносить препараты ДНК и положительный контрольный образец наконечниками с фильтром.

7.3.1.11 Центрифугируйте стрипы со смесями для амплификации Стрим в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – При постановке «Микропланшет 384 лунки» необходимо центрифугировать два стрипа со смесями для амплификации Стрим, при постановке «Половина микропланшета 384 лунки» – один стрип со смесями для амплификации Стрим.

7.3.1.12 Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, стрипы со смесью ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТaq МАХ, с разведенными образцами, «К–» и «К+», а также пустые стрипы и микропланшет ПЦР 384 лунки на рабочий стол ДТстрим.

7.3.1.13 Откройте стрипы со смесью для амплификации Стрим, аккуратно сняв защитную пленку или открыв крышки, и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3.1.14 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет ПЦР 384 лунки в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.3.1.15 Проведите процедуру запечатывания микропланшет ПЦР 384 лунки термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.3.1.16 Центрифугируйте микропланшет ПЦР 384 лунки при RCF(g) 500 в течение 30 с.

7.3.1.17 Поместите микропланшет ПЦР 384 лунки в детектирующий амплификатор.

7.3.1.18 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий файл. При последующих постановках выберите «Мультитест», добавьте в протокол тест «HPV_квант-21», укажите идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, и проведите ПЦР. При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 4.

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора ДТпрайм

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	05	15		Цикл
	94,0	0	05			
2	94,0	5	00	1		Цикл
3	94,0	0	30	5		Цикл
	64,0	0	15		√	
4	94,0	0	10	45		Цикл
	64,0	0	15		√	
5	94,0	0	5	1		Цикл
6	10,0 ¹	...	...	Хранение		Хранение

7.3.2 HPV квант-21 (вариант с предварительной подготовкой реагентов на дозирующем устройстве ДТстрим – «Интегрированный способ постановки»)

7.3.2.1 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К, буфером для разведения ДНК и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе. Для проведения 48 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки») используется две пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К, четыре пробирки с буфером для разведения ДНК и две пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ. Для проведения 24 определений одновременно (вариант постановки «Половина микропланшета 384 лунки») используется одна пробирка с ПЦР-буфером Стрим-К, две пробирки с буфером для разведения ДНК и одна пробирка с полимеразой ТехноТaq МАХ.

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

7.3.2.2 Центрифугируйте стрипы со смесями для амплификации Стрим в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – При постановке «Микропланшет 384 лунки» необходимо центрифугировать два стрипа со смесями для амплификации Стрим, при постановке «Половина микропланшета 384 лунки» – один стрип со смесями для амплификации Стрим.

7.3.2.3 Встряхните пробирки с полученными препаратами ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС-ПЛЮС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при RCF(g) 12000–16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.3.2.4 Установите пробирки на рабочий стол ДТстрим в штатив для образцов ДНК в соответствии с протоколом ЛИС.

7.3.2.5 Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К, буфером для разведения ДНК и полимеразой ТехноTaq MAX, а также пустые стрипы и микропланшет ПЦР 384 лунки на рабочий стол ДТстрим.

7.3.2.6 Откройте стрипы со смесью для амплификации Стрим, аккуратно сняв защитную пленку или открыв крышки, и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3.2.7 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет ПЦР 384 лунки в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.3.2.8 Проведите процедуру запечатывания микропланшет ПЦР 384 лунки термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.3.2.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР 384 лунки при RCF(g) 500 в течение 30 с.

7.3.2.10 Поместите микропланшет ПЦР 384 лунки в детектирующий амплификатор.

7.3.2.11 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий файл. Заполните протокол согласно инструкции к ЛИС¹. При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 4.

¹ – Лабораторная информационная система (ЛИС)

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов ПЦР осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

8.2 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, название исследования, индикаторный цикл (C_p), результат по каждому исследованию (относительный, абсолютный и качественный анализы).

8.3 По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

9.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

9.2 После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца, правильно расположив пробирки в термоблоке.

9.3 В результатах анализа необходимо учитывать значения контроля взятия материала (КВМ). Значение КВМ меньше **4,0 Lg** следует интерпретировать как недостаточное количество материала. В этом случае требуется повторное взятие клинического материала.

9.4 При наличии в исследуемом образце ДНК одного из типов вируса папилломы человека, выявляемых набором HPV КВАНТ, в строке с названием этого типа вируса в графе «Абс.» (абсолютный тип анализа) будет указано абсолютное количество (степень десятичного логарифма концентрации, копий ДНК HPV на образец) данного типа вируса в образце.

ВНИМАНИЕ! Программное обеспечение по умолчанию фиксирует только клинически значимую концентрацию вируса (более 10^3 копий ДНК HPV на 10^5 клеток человека (при корректном взятии материала)), которая характеризует высокий уровень инфекции, что может привести к развитию неоплазии шейки матки. Для образцов с меньшей концентрацией программа фиксирует отрицательный результат. Программное ограничение по концентрации вируса может быть снято пользователем или заменено на другое значение и тип анализа.

В графе «Отн.» (относительный тип анализа) будет указано количество ДНК данного типа вируса в образце, нормированное на количество клеток человека в исследуемом образце. По умолчанию нормирование производится на 10^5 клеток.

Примечание – По желанию пользователь может изменить параметр нормировки. Для этого необходимо нажать кнопку «Параметры анализа», в открывшемся окне нажать кнопку «Дополнительные настройки», выбрать закладку «Разное».

Данные, полученные с помощью относительного типа анализа, позволяют отслеживать динамику изменения вирусной нагрузки в процессе лечения, а также проводить сравнительный анализ количества вируса в разных образцах.

По желанию пользователя возможно вычисление суммарной нагрузки HPV. Результат вычисления суммарной нагрузки HPV будет представлен в специализированном отчёте.

В графе «Кач.» (качественный тип анализа) в случае, если он проводится, указывается только наличие или отсутствие ДНК выявляемых типов вируса в образце.

9.5 В случае отрицательного результата на наличие ДНК выявляемых типов HPV и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца. 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 необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение ДНК и постановку ПЦР для этого образца, либо взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

9.6 Для положительных контрольных образцов программа фиксирует положительный результат. При получении отрицательных значений результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.7 Для отрицательных контрольных образцов программа фиксирует отрицательный результат. При получении положительных значений результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

- 10.1.1 Транспортирование набора осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.
- 10.1.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ (HPV квант-21, фасовка А) при температуре от 2 °С до 8 °С не более 5 суток.
- 10.1.3 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

- 10.2.1 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.
- 10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.
- 10.2.3 Смеси для амплификации, запечатанные парафином, и смеси для амплификации Стрим следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.
- 10.2.4 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
- 10.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:
 - компоненты набора (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;
 - смеси для амплификации, запечатанные парафином и смеси для амплификации Стрим, 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 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.3.3 Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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 требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

12.3 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

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

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Каталожный номер
	Температурный диапазон		Адрес изготовителя
	Количество тестов		Не допускать воздействия солнечного света
	Годен до		Нестерильно
	Серия набора		Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изготовления		Одноразовое использование

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

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

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

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *ин витро*. Методы испытаний.

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

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

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

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании 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 EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

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

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

Место производства:

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов HPV КВАНТ, 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



175-9 2024-08-06



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления, типирования и количественного определения
вируса папилломы человека методом ПЦР

HPV КВАНТ

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2010/08811 от 02 августа 2024 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 НАЗНАЧЕНИЕ	8
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	9
2.1 Состав набора	9
2.2 Число анализируемых проб биологического материала	10
2.3 Принцип действия	11
2.4 Время проведения анализа	12
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	13
3.1 Аналитическая специфичность анализа	13
3.2 Предел обнаружения	13
3.3 Диагностические характеристики	13
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	14
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	16
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	17
6.1 Материалы для исследования	17
6.2 Взятие образцов соскобов эпителиальных клеток	17
6.3 Транспортировка и хранение исследуемых образцов	20
6.4 Подготовка (клинического) материала для исследования	20
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	21
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	21
7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S	21
7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А	24
8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	29
9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР	29
10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	31
10.1 Транспортирование	31
10.2 Хранение	31
10.3 Указания по эксплуатации	31
11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	32
12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	32
13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	32
14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА	32
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	33
16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	34

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ВПЧ	- вирус папилломы человека
ВОЗ	- Всемирная Организация Здравоохранения
CIN	- Cervical Intraepithelial Neoplasia
AIN	- Anal Intraepithelial Neoplasia
РШМ	- рак шейки матки
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ЛИС	- лабораторная информационная система
ИВ	- интерферирующие вещества
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ВК	- внутренний контроль
К+	- положительный контрольный образец
К-	- отрицательный контрольный образец

ВВЕДЕНИЕ

Папилломавирусная инфекция уrogenитального тракта – одна из наиболее часто встречающихся инфекций, передающихся преимущественно половым путем, возбудителем которой является вирус папилломы человека (ВПЧ). Известно более 100 типов ВПЧ, подробно описано около 80, из них более 30 поражают эпителий уrogenитального тракта, где наиболее чувствительна зона трансформации шейки матки и аногенитальной области. Вирус обладает тропностью к эпителиальным клеткам человека (наиболее чувствительна зона трансформации шейки матки), может вызывать доброкачественную пролиферацию тканей, а может быть причиной неопластической трансформации эпителия – предракового состояния и, соответственно, развития рака. По способности вызывать злокачественное перерождение эпителия, папилломавирусы делят на две группы – высокого (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 типы) и низкого (6, 11, 36, 42, 43, 44, 46, 47, 50 типы) онкогенного риска. Низкоонкогенные типы ассоциированы с доброкачественной пролиферации кожи и слизистых уrogenитальной, анальной областей, ротовой полости, гортани, проявляясь в виде генитальных и венерических бородавок, остроконечных и экзофитных кондилом. Высокоонкогенные типы ассоциированы с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями, наиболее эпидемиологически значимыми являются неопластическая трансформация шейки матки (CIN) и анальной области (AIN). Плоскоклеточному анальному раку, также, как и раку шейки матки, предшествуют предраковые поражения эпителиальной ткани. Наличие у женщин генитальных неоплазий повышает риск развития анального рака. В последние годы заболеваемость раком прямой кишки и ануса увеличивается на 1,7% в год, составляя 19,79 случаев на 100 тыс. населения, смертность – 11,56 случаев на 100 тыс. населения. На сегодняшний день доказана связь между персистенцией ВПЧ высокого онкогенного риска и развитием рака шейки матки. Заболеваемость РШМ не имеет тенденции к снижению, оставаясь на высоком уровне (21,27 случаев на 100 тыс. населения), в 8,44 случаях на 100 тыс. населения являясь причиной летального исхода [1; 3; 5; 7].

Рак шейки матки – одно из немногих злокачественных заболеваний с установленным этиологическим фактором. Высокоонкогенный ВПЧ может длительно персистировать в организме женщины, не вызывая РШМ, поэтому одного инфицирования эпителиальных клеток ВПЧ не достаточно для развития ракового перерождения. Возможно длительное, в течение десятилетий, латентное течение папилломавирусной инфекции, без клинических проявлений, характеризующееся бессимптомным ВПЧ-носительством, выявляемое только с помощью молекулярно-биологических методов. В возрасте до 30 лет, в 80% случаев вирус может самопроизвольно элиминироваться из организма в течение 24 месяцев и не иметь клинического значения. После 35 лет ВПЧ персистирует более продолжительное время. Скорость элиминации ВПЧ зависит от иммунореактивности клеток организма хозяина. Таким образом, выявление ВПЧ может являться фактором риска развития неопластической трансформации в будущем, а может быть маркером высокой вероятности наличия неопластической трансформации в данный момент [2; 4; 9].

Диагноз РШМ устанавливается на основании специфичных изменений в клеточных структурах, выявленных цитологическим методом. Однако по ряду объективных причин (высокая стоимость, нехватка врачей-цитологов в РФ и др.) метод не может быть широко внедрен в рутинную практику. Поэтому цитологическое исследование целесообразно использовать в качестве подтверждающего теста при проведении скрининга с использованием молекулярно-генетических методов, в т. ч. ПЦР. Выявление ВПЧ с помощью метода ПЦР позволяет отнести вирус-позитивных женщин к группе высокого риска развития неоплазии. Такие пациентки нуждаются в цитологическом обследовании для выбора тактики дальнейшего наблюдения и, при необходимости, лечения. ВПЧ-отрицательные пациентки могут не подвергаться цитологическому скринингу, т.е. применение молекулярно-генетических методов исследования позволяет заменить популяционный цитологический скрининг на скрининг в группе риска. Во избежание гипердиагностики и полипрагмазии скрининговые исследования с использованием молекулярно-генетических методов должны начинаться с 30-летнего возраста и проводиться с интервалом в 5 лет [2; 6; 8].

У мужчин ВПЧ-инфекция может вызывать нарушение показателей подвижности и фрагментацию ДНК в сперматозоидах [10]. В 2016 году была опубликована новая классификация ВОЗ рака полового члена. В этой классификации плоскоклеточные карциномы полового члена подразделяются на опухоли, связанные и не связанные с ВПЧ [11]. Генотипы высокого риска, такие как 16, 18, 31, 33, 45, 52 и 58, среди прочего, преимущественно инфицируют участки слизистой оболочки и связаны с развитием некоторых видов рака полового члена и анального канала у мужчин [12]. По данным метаанализа из 4199 случаев рака полового члена около половины случаев были связаны с ВПЧ-инфекцией [13] и ВПЧ-тестирование и экспрессии p16 имеют прогностическое значение в некоторых случаях, ВПЧ-ассоциированного рака у мужчин [14].

Присутствие вируса ВПЧ в сперме наблюдается у мужчин с воспалительными заболеваниями предстательной железы [15]. Также показана роль ВПЧ-инфекции в развитии рака предстательной железы [16,17,18]. Обнаружение у мужчин ВПЧ-16 служит маркером повышенного риска развития этого вида рака [18].

Вирус папилломы человека также может обнаруживаться в моче при воспалительных заболеваниях мочеполовой системы у женщин и мужчин [19,20], при онкопатологии шейки матки у женщин [21] и раке предстательной железы у мужчин [19].

Список литературы

1. Гинекология: национальное руководство / Под ред. В.И. Кулакова, Г.М. Савельевой, И.Б. Манухина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 1088 с.
2. Заболевания шейки матки и генитальные инфекции / Под ред. Проф. В.Н. Прилепской. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 384 с.
3. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. – 250 с.
4. Профилактика рака шейки матки: руководство для врачей / Под ред. акад. РАМН Г.Т. Сухих, проф. В.Н. Прилепской. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: МЕДпресс-информ, 2012. – 192 с.
5. Совершенствование методов диагностики и лечения предраковых заболеваний аногенитальной области, обусловленных ВПЧ-инфекцией: автореферат дис. кандидата медицинских наук: 14.01.01 / Л. А. Суламанидзе. – М., 2016. – 25 с.
6. Цитологический скрининг рака шейки матки [Текст]: методические рекомендации / С.Л. Воробьев, Т.М. Иванова, И.Н. Костючек, В.И. Новик, Е.Н. Славнова, В.П. Трошин, И.П. Шабалова. – Смоленск, 2013. – 15 с.
7. Anal human papillomavirus infection and abnormal anal cytology in women with genital neoplasia / I.U. Park, J.W. Ogilvie, K.E. Anderson, Zhong-ze Li, L. Darrah, R. Madoff, L. Downs // Gynecol Oncol. – 2009. – Vol. 114 (3). – P. 399–403.
8. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials / G. Ronco, J. Dillner, K.M. Elfstrom, S. Tunesi, P.J. Snijders, M. Arbyn, H. Kitchener, N. Segnan, C. Gilham, P. Giorgi-Rossi, J. Berkhof, J. Peto, C.J. Meijer // Lancet. – 2014. – Vol. 383. – № 9916. – P. 524–532.
9. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial / G. Ronco, P. Giorgi-Rossi, F. Carozzi, M. Confortini, P. Dalla Palma, A. Del Mistro, B. Ghiringhello, S. Girlando, A. Gillio-Tos, L. De Marco, C. Naldoni, P. Pierotti, R. Rizzolo, P. Schincaglia, M. Zorzi, M. Zappa, N. Segnan, J. Cuzick // The Lancet. Oncology. – 2010. – Vol. 11. – № 3. – P. 249–257.
10. Boeri L, Capogrosso P, Ventimiglia E et al. High-risk human papillomavirus in semen is associated with poor sperm progressive motility and a high sperm DNA fragmentation index in infertile men. Hum Reprod. 2019 Feb 1; 34(2):209–217.
11. Moch H, Cubilla A.L, Humphrey PA, et al. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part a: renal, penile, and testicular tumours. Eur Urol 2016; 70: 93–105.
12. Parkin D.M., Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. Vaccine, 2006, V 24, Supplement 3, Pages S11–S25.

13. Olesen T.B., Sand F.L., Rasmussen C.L. et al. Prevalence of human papillomavirus DNA and p16INK4a in penile cancer and penile intraepithelial neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2019; 20: 145–58.
14. Sand FL, Rasmussen CL, Frederiksen MH et al. Prognostic Significance of HPV and p16 Status in Men Diagnosed with Penile Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 2018, 27(10); 1123–32.
15. La Vignera S., Condorelli R.A., Cannarella R. et al. High rate of detection of ultrasound signs of prostatitis in patients with HPV-DNA persistence on semen: role of ultrasound in HPV-related male accessory gland infection. *J Endocrinol Invest*. 2019 Dec; 42(12):1459–1465. doi: 10.1007/s40618-019-01069-8.
16. Yin B., Liu W., Yu P. et al. Association between human papillomavirus and prostate cancer: A meta-analysis. *Oncol Lett*. 2017 Aug; 14(2):1855–1865. doi: 10.3892/ol.2017.6367.
17. Moghooei M., Keshavarz M., Ghorbani S. et al. Association between human papillomavirus infection and prostate cancer: A global systematic review and meta-analysis. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2019 Oct; 15(5):e59–e67. doi: 10.1111/ajco.13124.
18. Russo G.I., Calogero A.E., Condorelli R.A. et al. Human papillomavirus and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Aging Male*. 2018 Mar 23:1–7. doi: 10.1080/13685538.2018.1455178.
19. Nakashima K, Shigehara K, Kitamura T. et al. Risk factors for human papillomavirus detection in urine samples of heterosexual men visiting urological clinics in Japan. *J Infect Chemother*. 2018 Sep; 24(9):713–717. doi: 10.1016/j.jiac.2018.04.011.
20. Javanmard B., Barghi M.R., Amani D., Fallah Karkan M, Mazloomfard M.M. Human Papilloma Virus DNA in Tumor Tissue and Urine in Different Stage of Bladder Cancer. *Urol J*. 2019 Aug 18; 16(4):352–356. doi: 10.22037/uj.v0i0.4181.
21. Pattyn J., Van Keer S., Biesmans S. et al. Human papillomavirus detection in urine: Effect of a first-void urine collection device and timing of collection. *J Virol Methods*. 2019 Feb; 264:23–30. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.11.008.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для выявления, типирования и количественного определения вируса папилломы человека методом ПЦР (HPV КВАНТ), далее по тексту – набор реагентов.

1.2 Набор реагентов предназначен для выявления, типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 в биологическом материале человека (соскобы эпителиальных клеток, секрет простаты, эякулят, моча, биоптат) методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени.

1.3 Функциональное назначение медицинского изделия: Изделие предназначено для диагностики *in vitro* (выявления, типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 в биологическом материале человека).

1.4 Показания к проведению исследования: профилактический ВПЧ-скрининг предрака и рака шейки матки, диспансерный мониторинг пациентов с ВПЧ-инфекцией, диагностика ВПЧ-инфекции при онкопатологии шейки матки, полового члена, предстательной железы, ануса, гортани, воспалительных заболеваниях мочеполовой системы у женщин и мужчин.

1.5 Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.

1.6 Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

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

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов выпускается в следующих вариантах исполнения и фасовки:

- HPV квант-21, фасовка S;
- HPV квант-21, фасовка A;
- HPV квант-15, фасовка S;
- HPV квант-4, фасовка S.

Варианты исполнения различаются количеством показателей определяемых набором реагентов:

- HPV квант-21 – предназначен для выявления, типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 генотипов;
- HPV квант-15 – предназначен для выявления, группового типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 генотипов;
- HPV квант-4 – предназначен для выявления, типирования и количественного определения ДНК вируса папилломы человека HPV 6, 11, 16, 18 генотипов.

2.1 Состав набора

2.1.1 HPV квант-21

REF R1-P317-XA/4, фасовка A			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смеси для амплификации Стрим	Прозрачная голубая или светло-розовая жидкость	2 стрипа по 8 пробирок	по 120 мкл
ПЦР-буфер Стрим-К	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 600 мкл
Полимераза ТехноТaq МАХ	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2 пробирки	по 60 мкл
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 100 мкл
Стрипы по 8 пробирок	10 шт.		

REF R1-P317-S3/5, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под воскообразным белым слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы МАХ	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	160 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

2.1.2 HPV квант-15

REF R1-P316-S3/4, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость, под воскообразным белым слоем	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы MAX	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	160 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

2.1.3 HPV квант-4

REF R1-P315-S3/4, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации HPV 6, 11, запечатанная парафином	Прозрачная голубая жидкость, под воскообразным белым слоем	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Смесь для амплификации HPV 16, 18, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость, под воскообразным голубым слоем	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Смесь для амплификации KBM, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость, под воскообразным белым слоем	6 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	3 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	3 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	160 мкл
Крышки для стрипов	18 шт.		

2.2 Число анализируемых проб биологического материала

Набор реагентов предназначен для одноразового применения и рассчитан:

- в варианте исполнения HPV квант-21:
 - в фасовке А, на 48 определений, включая исследования положительных и отрицательных контрольных образцов.
 - в фасовке S, на 24 определения, включая исследования положительных и отрицательных контрольных образцов.
- в варианте исполнения HPV квант-15 (фасовка S) на 48 определений, включая исследования положительных и отрицательных контрольных образцов.
- в варианте исполнения HPV квант-4 (фасовка S) на 48 определений, включая исследования положительных и отрицательных контрольных образцов.

2.3 Принцип действия

Метод: Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный и количественный мультиплексный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается для стандартной фасовки набора реагентов методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина, для автоматизированной фасовки – модификацией полимеразы ТехноTaq MAX. Используемый подход исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В смеси для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт 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) возрастает пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В наборе, в состав смесей для амплификации добавлен внутренний контроль, предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

Одна из смесей предназначена для амплификации геномной ДНК человека и используется для контроля взятия клинического материала и нормирования количества ДНК HPV на количество клеток человека в данном образце.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации, включены флуоресцентные метки Fam, Rox и Cy5. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации внутреннего контроля (ВК), входит флуоресцентный краситель Hex (таблица 1).

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В определенные пробирки набора в вариантах исполнения HPV квант-21 и HPV квант-15 добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором как маркер определения положения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора. После прохождения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом несоответствии.

Исследование с использованием набора реагентов HPV КВАНТ состоит из этапов выделения ДНК (пробоподготовка) и проведения ПЦР в режиме реального времени.

Для проведения ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени используют детектирующие амплификаторы (ООО «НПО ДНК-Технология»): ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96 со специальным программным обеспечением.

Таблица 1 – Перечень показателей, выявляемых набором, каналы детекции продуктов амплификации и цветовая кодировка

HPV квант-21					
№ пробирки в стрипе	Каналы детекции				Цвет смеси / парафина*
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1	HPV 31	BK	HPV 35	HPV 16	Голубой / Белый
2	HPV 52	BK	HPV 33	HPV 68	Бесцветный или светло-розовый**/ Белый
3	HPV 45	BK	HPV 82	HPV 51	
4	HPV 6	BK	HPV 44	HPV 11	
5	HPV 18	BK	HPV 39	HPV 58	
6	HPV 66	BK	HPV 26	HPV 53	
7	HPV 59	BK	HPV 56	HPV 73	
8	KBM	BK	маркер	отсутствует	
* – парафин присутствует только в пробирках со смесью для амплификации фасовки S					
** – для наборов в фасовке А					
HPV квант-15					
№ пробирки в стрипе	Каналы детекции				Цвет смеси / парафина
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1, 5	HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58	BK	отсутствует	HPV 56	Голубой / Белый
2, 6	HPV 18, 39, 45, 59	BK	отсутствует	HPV 6, 11	Бесцветный / Белый
3, 7	HPV 51	BK	маркер	HPV 68	
4, 8	KBM	BK	отсутствует	отсутствует	
HPV квант-4					
Смесь для амплификации	Каналы детекции				Цвет смеси / парафина
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
HPV 6,11	HPV 6	BK	отсутствует	HPV 11	Голубой / Белый
HPV 16,18	HPV 18	BK	отсутствует	HPV 16	Бесцветный / Голубой
KBM	KBM	BK	отсутствует	отсутствует	Бесцветный / Белый

2.4 Время проведения анализа (с учётом пробоподготовки) – от 2,5 часов.

¹ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2

² – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Аналитическая специфичность анализа

В образцах исследуемого материала, содержащих ДНК выявляемого генотипа HPV, во время проведения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительные результаты для специфических продуктов по заявленным каналам детекции.

В образцах исследуемого материала, не содержащих ДНК выявляемого генотипа HPV, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует отрицательные результаты для специфических продуктов по заявленным каналам детекции.

В образцах исследуемого материала, в котором присутствует геномная ДНК человека, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительный результат в соответствующей пробирке.

В образцах биологического материала, в котором отсутствует геномная ДНК человека, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует отрицательный результат в соответствующей пробирке.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК следующих бактерий и вирусов: *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp., EBV, HHV6, HHV8, HSV1, HSV2, VZV.

3.2 Предел обнаружения

Предел обнаружения для генотипов HPV составляет 5 копий ДНК на амплификационную пробирку (10^3 копий/мл препарата ДНК). Предел обнаружения установлен путем анализа серийных разведений лабораторных контрольных образцов (ЛКО).

Предел обнаружения зависит от вида биоматериала, используемого комплекта/набора реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения) выделенной ДНК.

Пример: Предел обнаружения для набора составляет 600 копий/образец при выделении ДНК из образца комплектами/наборами ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ (объем элюции 300 мкл).

3.3 Диагностические характеристики

Количество образцов (n) – 191;

Диагностическая чувствительность составляет (95% ДИ) – 99,3% (96,7–100%);

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ) – 99,9% (99,8–99,9%).

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

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

При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька (неопудренные).

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

Этап ПЦР в реальном времени следует проводить в помещении, снабженном комплектами полуавтоматических или автоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

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

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

ВНИМАНИЕ! Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации.

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.

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями 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	Вариант исполнения		
	HPV квант-21	HPV квант-15	HPV квант-4
Фасовка А			
Смеси для амплификации Стрим	Нет опасных веществ	–	–
ПЦР-буфер Стрим-К	Нет опасных веществ	–	–
Полимераза ТехноТaq МАХ	Нет опасных веществ	–	–
Буфер для разведения ДНК	Нет опасных веществ	–	–
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	–	–
Фасовка S			
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	–
Смесь для амплификации HPV 6, 11, запечатанная парафином	–	–	Нет опасных веществ
Смесь для амплификации HPV 16, 18, запечатанная парафином	–	–	Нет опасных веществ
Смесь для амплификации KBM, запечатанная парафином	–	–	Нет опасных веществ
Раствор Taq-полимеразы МАХ	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	–
Раствор Taq-полимеразы	–	–	Нет опасных веществ
Минеральное масло	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ	Нет опасных веществ
Положительный контрольный образец	Азид натрия менее 0,1%	Азид натрия менее 0,1%	Азид натрия менее 0,1%

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

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

Не допускается использовать набор реагентов:

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

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 HPV КВАНТ требуется следующее оборудование, реагенты и расходные материалы:

Оборудование, реагенты и расходные материалы	Вариант фасовки	
	S	A
ПЦР-бокс	да	да
амплификатор детектирующий	да	да
дозирующее устройство ДТстрим	нет	да
герметизирующее устройство ДТпак	нет	да
холодильник или холодильная камера	да	да
морозильная камера	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да
центрифуга для микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 10 до 100 мкл	да	нет
дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 20 до 200 мкл	нет	да
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом от 1,0 до 20 мкл, от 1,0 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл	да	нет
одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом от 1,0 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл	да	да
микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да
полимерная термопленка для запаивания микропланшет ПЦР 384 лунки	нет	да
одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные	да	да
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл	да	да
ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да

Приборное обеспечение

Для проведения ПЦР используют амплификаторы детектирующие: ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.3.5.84; файл с параметрами анализа.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материалы для исследования

В качестве биологического материала используют биологический материал человека: соскобы эпителиальных клеток, секрет простаты, эякулят, моча, биоптат.

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

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.

Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см. пп.2.3, 9.5).

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

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

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

6.2 Взятие образцов соскобов эпителиальных клеток

Взятие соскобов проводится стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований.

6.2.1 Общие требования

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

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

6.2.2 Материал для исследований

Решение о выборе места взятия материала для исследования на наличие вируса папилломы человека принимает лечащий врач на основании совокупности жалоб пациента и клинической картины.

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. Неправильное взятие может привести к невозможности получения достоверного результата и, вследствие этого, необходимости повторного взятия биоматериала.

6.2.3 Особенности взятия материала из уретры:

- соскоб выполняют стерильным одноразовым зондом;
- 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;
- в уретру зонд вводится на глубину 1,0–1,5 см, затем осторожными вращательными движениями продвигается к наружному отверстию уретры.

6.2.4 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.

6.2.5 Особенности взятия материала из влагалища с использованием устройства для самостоятельного забора проб.

- Взятие материала проводят в соответствии с инструкцией к устройству.

6.2.6 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 исключить его касание стенок влагалища.

6.2.7 Особенности взятия материала с шейки матки:

- материал берётся до проведения мануального исследования;
- перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь, воспалительный экссудат или кровь (если они есть);

- далее необходимо аккуратно соскоблить эксфолиативный клеточный материал и поверхностный эпителий из влагалищной порции шейки матки, области зоны трансформации и/или цервикального канала, если соединение многослойного плоского и призматического эпителия смещено в цервикальный канал.

6.2.8 Порядок взятия соскобного материала в пробирку с транспортной средой:

- откройте крышку пробирки;
- с помощью одноразового зонда сделайте соскоб эпителиальных клеток из соответствующего биотопа (влагалище, уретра, цервикальный канал, анальное отверстие, ротоглотка);
- перенесите зонд с биоматериалом в пробирку с транспортной средой и тщательно прополощите его, избегая разбрызгивания жидкости;
- извлеките зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и удалите избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизируйте;
- плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте.

6.2.9 Особенности получения секрета предстательной железы

- перед взятием секрета простаты рекомендуется половое воздержание в течение трех суток до исследования;
- непосредственно 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. После окончания массажа выделившийся простатический секрет в виде свободно стекающей капли (0,15–1,0 мл) собирают в одноразовую сухую стерильную пробирку объёмом 2 мл или контейнер объёмом до 60 мл;
- ёмкость с секретом простаты герметично закрывают крышкой и маркируют.

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

6.2.10 Особенности получения эякулята

- перед сбором 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 и собирают в стерильный контейнер объёмом до 60 мл;
- ёмкость с эякулятом герметично закрывают крышкой и маркируют.

6.2.11 Моча

- для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20–30 мл. Отбор мочи проводят в специальную сухую стерильный ёмкость объёмом до 60 мл, снабжённую герметично закрывающейся крышкой
- после сбора мочи контейнер плотно закрывают и маркируют

6.2.12 Биопсийный материал

- биопсийный материал (биоптат) помещают в стерильную пробирку со стерильным физраствором или водой (не более 0,5 мл) или в пустую стерильную пробирку;
- ёмкость с биоптатом герметично закрывают крышкой и маркируют.

6.3 Транспортировка и хранение исследуемых образцов

Образцы до начала исследования хранить при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 часов¹. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Замороженный материал хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

6.4 Подготовка (клинического) материала для исследования

6.4.1 Подготовка материала из влагалища, взятого с использованием устройства для самостоятельного забора проб:

- добавьте в пробирку (или другую ёмкость, указанную в инструкции к устройству для самостоятельного забора проб (далее «пробирка»)), в которой находится наконечник устройства, 500 мкл физиологического раствора, закройте пробирку;
- встряхните пробирку в течение 15 с на микроцентрифуге-вортексе;
- инкубируйте пробирку в течение 3–5 минут при комнатной температуре;
- центрифугируйте пробирку в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе;
- извлеките наконечник устройства из пробирки и выбросьте;
- перенесите содержимое пробирки в чистую пробирку объёмом 1,5 мл;
- центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000–16000 в течение 10 мин;
- удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

6.4.2 Подготовка мочи

- перенесите 1,0 мл материала из контейнера в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл;
- центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000–16000 в течение 10 мин;
- наиболее полно удалите надосадочную жидкость;
- добавьте к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного;
- центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000–6000 в течение 10 мин;
- удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

¹ – при использовании транспортной среды срок хранения образцов устанавливается в соответствии с инструкцией к используемой транспортной среде

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Контроль качества выделенной ДНК осуществляется в ходе ПЦР с помощью системы внутреннего контроля (ВК).

Для выделения ДНК рекомендуется использовать комплекты/наборы реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-МЧ-РАПИД (ООО «НПО ДНК-Технология», ООО «ДНК-Технология ТС», Россия) или другие комплекты/наборы реагентов, имеющие регистрационные удостоверения медицинского изделия и предназначенные для выделения ДНК из соответствующих видов биоматериала с целью последующего исследования методом ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта/набора для выделения ДНК из биологического материала одновременно необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор, в объеме, указанном в инструкции к комплекту/набору реагентов для выделения ДНК.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S

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

7.2.1 HPV квант-4

7.2.1.1 Промаркируйте по одной пробирке из стрипов со смесями для амплификации, запечатанными парафином (HPV 6,11; HPV 16,18; KBM) для каждого анализируемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Примечание – Для HPV квант-4 один стрип рассчитан на исследование восьми образцов.

Пример:

Необходимо проанализировать два образца. Для этого нужно промаркировать 12 пробирок в трех стрипах – шесть для исследуемых образцов и по три для «К-» и «К+».

7.2.1.2 Далее выполните пункты 7.2.4 – 7.2.11.

7.2.2 HPV квант-15

7.2.2.1 Промаркируйте стрипы с запечатанными парафином смесями для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Примечание – Для HPV квант-15 один стрип рассчитан на исследование двух образцов.

Пример:

Необходимо проанализировать два образца. Для этого нужно промаркировать два стрипа – один для исследуемых образцов, один для «К-» и «К+».

7.2.2.2 Далее выполните пункты 7.2.4 – 7.2.11.

7.2.3 HPV квант-21

7.2.3.1 Промаркируйте по одному стрипу с запечатанными парафином смесями для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).

Примечание – Для HPV квант-21 один стрип рассчитан на исследование одного образца.

Пример:

Необходимо проанализировать два образца. Для этого нужно промаркировать 4 стрипа – два для исследуемых образцов, один для «К-» и один для «К+».

7.2.3.2 Далее выполните пункты 7.2.4 – 7.2.11.

7.2.4 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы (для HPV квант-15 и HPV квант-21 – с раствором Таq-полимеразы МАХ) в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.5 Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы (для HPV квант-15 и HPV квант-21 – раствора Таq-полимеразы МАХ).

7.2.6 Добавьте в каждую пробирку по одной капле минерального масла (около 20 мкл). Закройте крышки стрипов.

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

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС-ПЛЮС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при RCF(g) 12000–16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

3. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.8 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки стрипа, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК. В пробирки «К-», «К+» ДНК не вносится.

- 7.2.9 Внесите в стрипованные пробирки, промаркированные «К–», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см. п.7.1).
- 7.2.10 Внесите в стрипованные пробирки, промаркированные «К+», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.2.11 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 7.2.12 Установите стрипы в блок детектирующего амплификатора.
- 7.2.13 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». Загрузите соответствующий файл. Добавьте в протокол соответствующие тесты, укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. п.7.2.12) и проведите ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Программа амплификации для теста «HPV квант-15» отличается от программы амплификации для тестов «HPV квант-4» и «HPV квант-21». Не допускается использование тестов «HPV квант-15» и «HPV квант-4», «HPV квант-21» для одной постановки.

- 7.2.14 При выборе тестов «HPV квант-4» и «HPV квант-21» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 2. При выборе теста «HPV квант-15» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 3.

Таблица 2 – Программа амплификации для тестов «HPV квант-4» и «HPV квант-21»

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

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

Таблица 3 – Программа амплификации для теста «HPV квант-15»

№ блока	Температура, °С	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	30	1		Цикл
	94,0	1	30			
2	94,0	0	30	5		Цикл
	60,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		Цикл
	60,0	0	15		√	
4	94,0	0	5	1		Цикл
5	10,0 ¹	...	...	Хранение		Хранение

Тесты (файлы) для приборов ДТпрайм, ДТлайт и ДТ-96 предоставляются производителем набора реагентов.

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А

7.3.1 HPV квант-21 (вариант с предварительной подготовкой реагентов ручным дозированием – «Базовый способ постановки»)

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

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

7.3.1.2 Приготовьте смесь ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТaq МАХ. Внесите в пробирку с ПЦР-буфером Стрим-К весь объём одной пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ, т.е. 600 мкл ПЦР-буфера Стрим-К плюс 60 мкл полимеразы ТехноТaq МАХ:

- при проведении 48 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки») необходимо использовать две пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К и две пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ;
- при проведении 24 определений одновременно (вариант постановки «Половина микроплшета 384 лунки») необходимо использовать одну пробирку с ПЦР-буфером Стрим-К и одну пробирку с полимеразой ТехноТaq МАХ.

7.3.1.3 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТaq МАХ в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

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

- 7.3.1.4 Аккуратно, без образования воздушных пузырей, внесите в восемь пробирок пустого стрипа по 140 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТaq МАХ при постановке 48 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки»), или по 75 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТaq МАХ при постановке 24 определений одновременно (вариант постановки «Половина микропланшета 384 лунки»).
- 7.3.1.5 Центрифугируйте стрип в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.3.1.6 Промаркируйте шесть пустых стрипов, из состава набора, при постановке 48 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки»), или три пустых стрипа при постановке 24 определения одновременно (вариант постановки «Половина микропланшета 384 лунки»).
- 7.3.1.7 Встряхните пробирки с буфером для разведения ДНК в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.3.1.8 Внесите в каждую пробирку промаркированных стрипов по 60 мкл буфера для разведения ДНК.
- 7.3.1.9 Встряхните пробирки с полученными препаратами ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС-ПЛЮС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при RCF(g) 12000–16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
 2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.
- 7.3.1.10 Аккуратно, без образования воздушных пузырей, внесите в соответствующие пробирки стрипов с буфером для разведения ДНК по 24 мкл препарата ДНК исследуемых образцов, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

ВНИМАНИЕ! Во избежание контаминации рекомендуется вносить препараты ДНК и положительный контрольный образец наконечниками с фильтром.

7.3.1.11 Центрифугируйте стрипы со смесями для амплификации Стрим в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – При постановке «Микропланшет 384 лунки» необходимо центрифугировать два стрипа со смесями для амплификации Стрим, при постановке «Половина микропланшета 384 лунки» – один стрип со смесями для амплификации Стрим.

7.3.1.12 Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, стрипы со смесью ПЦР-буфера Стрим-К и полимеразы ТехноТaq МАХ, с разведенными образцами, «К–» и «К+», а также пустые стрипы и микропланшет ПЦР 384 лунки на рабочий стол ДТстрим.

7.3.1.13 Откройте стрипы со смесью для амплификации Стрим, аккуратно сняв защитную пленку или открыв крышки, и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3.1.14 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет ПЦР 384 лунки в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.3.1.15 Проведите процедуру запечатывания микропланшет ПЦР 384 лунки термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.3.1.16 Центрифугируйте микропланшет ПЦР 384 лунки при RCF(g) 500 в течение 30 с.

7.3.1.17 Поместите микропланшет ПЦР 384 лунки в детектирующий амплификатор.

7.3.1.18 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий файл. При последующих постановках выберите «Мультитест», добавьте в протокол тест «HPV_квант-21», укажите идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, и проведите ПЦР. При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 4.

Таблица 4 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора ДТпрайм

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	05	15		Цикл
	94,0	0	05			
2	94,0	5	00	1		Цикл
3	94,0	0	30	5		Цикл
	64,0	0	15		√	
4	94,0	0	10	45		Цикл
	64,0	0	15		√	
5	94,0	0	5	1		Цикл
6	10,0 ¹	...	...	Хранение		Хранение

7.3.2 HPV квант-21 (вариант с предварительной подготовкой реагентов на дозирующем устройстве ДТстрим – «Интегрированный способ постановки»)

7.3.2.1 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К, буфером для разведения ДНК и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе. Для проведения 48 определений одновременно (вариант постановки «Микропланшет 384 лунки») используется две пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К, четыре пробирки с буфером для разведения ДНК и две пробирки с полимеразой ТехноТaq МАХ. Для проведения 24 определений одновременно (вариант постановки «Половина микропланшета 384 лунки») используется одна пробирка с ПЦР-буфером Стрим-К, две пробирки с буфером для разведения ДНК и одна пробирка с полимеразой ТехноТaq МАХ.

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

7.3.2.2 Центрифугируйте стрипы со смесями для амплификации Стрим в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – При постановке «Микропланшет 384 лунки» необходимо центрифугировать два стрипа со смесями для амплификации Стрим, при постановке «Половина микропланшета 384 лунки» – один стрип со смесями для амплификации Стрим.

7.3.2.3 Встряхните пробирки с полученными препаратами ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

¹ – допускается хранение при температуре 25 °C

ВНИМАНИЕ!

1. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС-ПЛЮС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при RCF(g) 12000–16000 в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

2. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо после встряхивания поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование производится на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 с.

7.3.2.4 Установите пробирки на рабочий стол ДТстрим в штатив для образцов ДНК в соответствии с протоколом ЛИС.

7.3.2.5 Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, пробирки с ПЦР-буфером Стрим-К, буфером для разведения ДНК и полимеразой ТехноTaq MAX, а также пустые стрипы и микропланшет ПЦР 384 лунки на рабочий стол ДТстрим.

7.3.2.6 Откройте стрипы со смесью для амплификации Стрим, аккуратно сняв защитную пленку или открыв крышки, и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3.2.7 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет ПЦР 384 лунки в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.

7.3.2.8 Проведите процедуру запечатывания микропланшет ПЦР 384 лунки термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.3.2.9 Центрифугируйте микропланшет ПЦР 384 лунки при RCF(g) 500 в течение 30 с.

7.3.2.10 Поместите микропланшет ПЦР 384 лунки в детектирующий амплификатор.

7.3.2.11 Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий файл. Заполните протокол согласно инструкции к ЛИС¹. При выборе тестов в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 4.

¹ – Лабораторная информационная система (ЛИС)

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация результатов ПЦР осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

8.2 На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, название исследования, индикаторный цикл (C_p), результат по каждому исследованию (относительный, абсолютный и качественный анализы).

8.3 По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

9.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

9.2 После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца, правильно расположив пробирки в термоблоке.

9.3 В результатах анализа необходимо учитывать значения контроля взятия материала (КВМ). Значение КВМ меньше **4,0 Lg** следует интерпретировать как недостаточное количество материала. В этом случае требуется повторное взятие клинического материала.

9.4 При наличии в исследуемом образце ДНК одного из типов вируса папилломы человека, выявляемых набором HPV КВАНТ, в строке с названием этого типа вируса в графе «Абс.» (абсолютный тип анализа) будет указано абсолютное количество (степень десятичного логарифма концентрации, копий ДНК HPV на образец) данного типа вируса в образце.

ВНИМАНИЕ! Программное обеспечение по умолчанию фиксирует только клинически значимую концентрацию вируса (более 10^3 копий ДНК HPV на 10^5 клеток человека (при корректном взятии материала)), которая характеризует высокий уровень инфекции, что может привести к развитию неоплазии шейки матки. Для образцов с меньшей концентрацией программа фиксирует отрицательный результат. Программное ограничение по концентрации вируса может быть снято пользователем или заменено на другое значение и тип анализа.

В графе «Отн.» (относительный тип анализа) будет указано количество ДНК данного типа вируса в образце, нормированное на количество клеток человека в исследуемом образце. По умолчанию нормирование производится на 10^5 клеток.

Примечание – По желанию пользователь может изменить параметр нормировки. Для этого необходимо нажать кнопку «Параметры анализа», в открывшемся окне нажать кнопку «Дополнительные настройки», выбрать закладку «Разное».

Данные, полученные с помощью относительного типа анализа, позволяют отслеживать динамику изменения вирусной нагрузки в процессе лечения, а также проводить сравнительный анализ количества вируса в разных образцах.

По желанию пользователя возможно вычисление суммарной нагрузки HPV. Результат вычисления суммарной нагрузки HPV будет представлен в специализированном отчёте.

В графе «Кач.» (качественный тип анализа) в случае, если он проводится, указывается только наличие или отсутствие ДНК выявляемых типов вируса в образце.

9.5 В случае отрицательного результата на наличие ДНК выявляемых типов HPV и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца. 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 необходимо повторно провести ПЦР, либо выделение ДНК и постановку ПЦР для этого образца, либо взятие клинического материала у пациента (выполняется последовательно).

9.6 Для положительных контрольных образцов программа фиксирует положительный результат. При получении отрицательных значений результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.7 Для отрицательных контрольных образцов программа фиксирует отрицательный результат. При получении положительных значений результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

- 10.1.1 Транспортирование набора осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.
- 10.1.2 Допускается транспортирование полимеразы ТехноТaq МАХ (HPV квант-21, фасовка А) при температуре от 2 °С до 8 °С не более 5 суток.
- 10.1.3 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

- 10.2.1 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.
- 10.2.2 Полимеразу ТехноТaq МАХ следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.
- 10.2.3 Смеси для амплификации, запечатанные парафином, и смеси для амплификации Стрим следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.
- 10.2.4 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

- 10.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.
- 10.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:
 - компоненты набора (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;
 - смеси для амплификации, запечатанные парафином и смеси для амплификации Стрим, 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 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора реагентов.
- 10.3.3 Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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 требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

12.3 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

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

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Каталожный номер
	Температурный диапазон		Адрес изготовителя
	Количество тестов		Не допускать воздействия солнечного света
	Годен до		Нестерильно
	Серия набора		Обратитесь к инструкции по применению
	Дата изготовления		Одноразовое использование

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

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

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

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *ин витро*. Методы испытаний.

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

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

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

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании 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 EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

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

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

Место производства:

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

По вопросам, касающимся качества набора реагентов HPV КВАНТ, 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



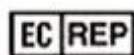
600-3 2025-02-13



For professional use only

STOR-M transport medium

INSTRUCTION FOR USE



OBELIS S.A

Registered Address:

Bd. Général Wahis, 53

1030 Brussels, Belgium

Tel: +32.2.732.59.54

Fax: +32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net<http://www.obelis.net>"DNA-Technology Research &
Production", LLC,

142281, Russia,

Moscow Region, Protvino,

Zheleznodorozhnaya Street, 20

Phone/fax: +7(495) 640.17.71

E-mail: info@dna-technology.com<https://www.dna-technology.com>

Customer service department

E-mail: hotline@dna-technology.ru

P-910-1/1EU

P-911-1/1EU



600-3.2025.02.13

TABLE OF CONTENTS

1. INTENDED USE	3
2. METHOD	3
3. CONTENT	3
4. REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED	4
5. TRANSPORT AND STORAGE CONDITIONS	4
6. WARNINGS AND PRECAUTIONS	5
7. SAMPLES	6
8. PROCEDURE	6
9. SPECIFICATIONS	7
10. QUALITY CONTROL	8
11. KEY TO SYMBOLS	9

1. INTENDED USE

The **STOR-M transport medium** is intended for transport and storage of human biological samples (scrapes/swabs of epithelial cells from urogenital tract, oropharynx, nasopharynx, rectum, skin, conjunctiva of the eye), including those containing an impurity of mucus, followed by nucleic acids analysis (human and microbial DNA, viral RNA) by polymerase chain reaction and reverse transcription (PCR/RT-PCR) methods.

This medical device is an auxiliary agent in clinical laboratory diagnostics.

The application of the kit does not depend on population and demographic aspects. There are no contradictions for use of the **STOR-M transport medium**.

The **STOR-M transport medium** can be used in clinical and diagnostic laboratories of medical institutions and research practice.

Potential users: personnel qualified in molecular diagnostics methods and working in the clinical and diagnostic laboratory.

It is necessary to apply the kit only as directed in this instruction for use.

2. METHOD

The **STOR-M transport medium** is a ready-to-use water-salt transparent, colorless solution with the addition of a preservative, mucolytic and flavoring agent. The preservative prevents the growth of non-specific microorganisms, and mucolytic acts on disulfide bonds of mucopolysaccharides, thereby diluting mucus.

3. CONTENT

The detailed description of content is represented in Tables 1-2.

Table 1. The **STOR-M transport medium** content, package S, 500 for P-910-1/1EU

Reagent	Description	Total volume	Amount
Transport medium	Colorless transparent liquid	50 mL (500 µL in each)	100 tubes

Table 2. The **STOR-M transport medium** content, package S, 1000 for P-911-1/1EU

Reagent	Description	Total volume	Amount
Transport medium	Colorless transparent liquid	100 mL (1.0 mL in each)	100 tubes

All components are ready to use and do not require additional preparation for operation.

The kit is intended for single use and designed for 100 tests, including negative controls.

4. REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

4.1. Specimen collection

- Specimen collection swabs: sterile single use swabs, cytobrushes, cotton swabs e.t.c for sampling of biomaterial.

4.2. Preparation for NA extraction

- Biological safety cabinet class II;
- Vortex mixer;
- Refrigerator;
- NA extraction kit;
- High speed centrifuge (RCF(g) no less than 12,000);
- Tube rack for 1.5 mL tubes;
- Container for used pipette tips, tubes and other consumables;
- Single channel pipettes (dispensers covering 100-1000 µL volume range);
- RNase and DNase free filtered pipette tips (volume 1000 µL);
- Powder-free surgical gloves;
- Disinfectant solution;
- Nucleic acid extraction kit.

5. TRANSPORT AND STORAGE CONDITIONS

Expiry date – 12 months from the date of production.

The **STOR-M transport medium** must be transported in thermoboxes with ice packs by all types of roofed transport at temperatures inside the thermoboxes corresponding to storage conditions of the kit components.

It is allowed to transport the kit in thermoboxes with ice packs by all types of roofed transport at temperatures from 2 °C to 25 °C inside the thermoboxes, but for no longer than 14 days.

The kit transported with violation of temperature conditions must not be used.

All components of the **STOR-M transport medium** must be stored in a refrigerator or a cooling chamber at temperatures from 2 °C to 8 °C over the storage period.

The excessive temperature can be detrimental to product performance.

Shelf-life of the kit following the first opening of the primary container: components of the kit must be stored in a refrigerator or a cooling chamber at temperatures from 2 °C to 8 °C over the storage period.

The kit stored under undue regime must not be used.

An expired **STOR-M transport medium** must not be used.

We strongly recommend to follow the given instructions in order to obtain accurate and reliable results.

The conformity of the **STOR-M transport medium** to the prescribed technical requirements is subject to compliance of storage, transportation and handling conditions recommended by manufacturer.

Contact our official representative in EU by quality issues of the **STOR-M transport medium**.

6. WARNINGS AND PRECAUTIONS

Only personnel trained in the methods of molecular diagnostics and the rules of work in the clinical and diagnostic laboratory are allowed to work with the kit.

Handle and dispose all biological samples, reagents and materials used to carry out the assay as if they were able to transmit infective agents. The samples must be exclusively employed for certain type of analysis. Samples must be handled under a laminar flow hood. Tubes containing different samples must never be opened at the same time. Pipettes used to handle samples must be exclusively employed for this specific purpose. The pipettes must be of the positive dispensation type or be used with aerosol filter tips. The tips employed must be sterile, free from the DNases and RNases, free from DNA and RNA. The reagents must be handled under a laminar flow hood. The reagents required for amplification must be prepared in such a way that they can be used in a single session. Pipettes used to handle reagents must be exclusively employed for this specific purpose. The pipettes must be of the positive dispensation type or be used with aerosol filter tips. The tips employed must be sterile, free from the DNases and RNases, free from DNA and RNA. Avoid direct contact with the biological samples reagents and materials used to carry out the assay. Wear powder-free surgical gloves. Wear protective clothing (work clothes and personal protective equipment) working with microorganisms classified as particularly pathogenic. The protective clothing and personal protective equipment must comply with the work to be performed and health and safety requirements. Avoid producing spills or aerosol. Any material being exposed to biological samples must be treated for at least 30 minutes with disinfecting solution or autoclaved for 1 hour at 121 °C before disposal.

Molecular biology procedures, such as nucleic acids extraction, reverse transcription, PCR-amplification and detection require qualified staff to avoid the risk of erroneous results, especially due to the degradation of nucleic acids contained in the samples or sample contamination by amplification products.

All the liquid solutions are designed for single use and can not be used more than once. Plastic tubes do not contain phthalates. Do not breathe gas/fumes/vapor/spray produced by the components of the kit. Do not eat/drink components of the kit. Avoid contact with eyes. Only use the reagents provided in the kit and those recommended by manufacturer. Do not mix reagents from different batches. Do not use reagents from third party manufacturers' kits. All laboratory equipment, including dispensers, test tube racks, laboratory glassware, lab coats, bouffant caps, etc., as well as reagents should be strictly stationary. It is not allowed to move them from one room to another. Waste materials are disposed of in accordance with local and national standards. All surfaces in the laboratory (work tables, test tube racks, equipment, etc.) must be treated daily with disinfecting solution.

Emergency actions

Eye Contact: If any component of this kit enters the eyes, wash eyes gently under potable running water for 15 minutes or longer, making sure that the eyelids are held open. If pain or irritation occurs, obtain medical attention.

Skin Contact: If any component of this kit contacts the skin and causes discomfort, remove any contaminated clothing. Wash affected area with plenty of soap and water. If pain or irritation occurs, obtain medical attention.

Ingestion: If any component of this kit is ingested, wash mouth out with water. If irritation or discomfort occurs, obtain medical attention.

Do not use the kit:

- When the transportation and storage conditions are breached;
- When the reagents' appearance does not respond to the kit passport;
- When the kit components packaging is breached;
- After the expiry date provided.

Significant health effects are **NOT** anticipated from routine use of this kit when adhering to the instructions listed in the current manual.

7. SAMPLES

The **STOR-M transport medium** is designed to transport and storage the scrapes/swabs of epithelial cells from urogenital tract, oropharynx, nasopharynx, rectum, skin, conjunctiva of the eye.

General requirements

Remove free separable mucus with a sterile cotton prior to sampling. In case of sampling from several locations, repeat the procedure several times, each time taking a new swab into new different tube.

To prevent contamination, open the tube, add sample, then close the tube before proceeding to the next sample.

Scrapes/swabs of epithelial cells sampling

Method limitations: local use of medications, vaginal ultrasound less than 24 hours before the test.

WARNING!

1. The use of cytobrushes for urogenital swabs/scrapes is contraindicated in pregnancy.
2. To prevent contamination only open the tube you are working with and close the cap before proceeding to the next tube.

Order of taking:

1. Scrape epithelial cells from the corresponding biotope (i.e. urogenital tract, oropharynx, nasopharynx, rectum, skin, conjunctiva of the eye) with a sterile swab, transfer it to a 1.5 mL plastic tube with STOR-M transport medium and wash it thoroughly for 10-15 seconds. Avoid splashing.
2. Remove swab from solution, press it to the wall of the tube above the solution level and squeeze the rest of the liquid with a rotating liquid. Remove the swab from the tube and dispose of it.
3. Close the tube tightly and mark it.

Transportation and storage of the samples

Transport and store samples in **STOR-M transport medium** for subsequent analysis of human and microbial DNA at temperatures from 2 °C to 8 °C for no longer than 3 months.

Transport and store samples in **STOR-M transport medium** for subsequent analysis of viral RNA at temperatures from 2 °C to 8 °C for no longer than 28 days.

Transport and store samples in **STOR-M transport medium** for subsequent analysis of human and microbial DNA at temperatures from 18 °C to 25 °C is acceptable for no longer than 28 days.

Transport and store samples in **STOR-M transport medium** for subsequent analysis of viral RNA at temperatures from 18 °C to 25 °C is acceptable for no longer than 7 days.

8. PROCEDURE

8.1. General recommendations

1. Use only disposable RNase and DNase free filtered pipette tips.
2. When adding the solution into sample, do not touch the walls of the tubes with the tip. If the tip has touched the wall of the tube, change the tip. Tip should be changed each time when you take out solution from the tube with sample.
3. To prevent contamination, open the tube, add sample/reagent, then close the tube before proceeding to the next sample/reagent.

8.2. Preparation for NA extraction (package S, 500; package S, 1000)

8.2.1 Centrifuge samples in transport medium at RCF(g) 12,000 for 10 minutes.

8.2.2 Remove the supernatant, leaving the approximately 100 µL (precipitate+liquid fraction) in the tube.

WARNING! If for sample pretreatment centrifugation is not needed, p.8.2.1 and 8.2.2 are not performed.

WARNING! For scrape/swab from oropharynx and nasopharynx for subsequent analysis of viral RNA preliminary centrifugation is not required.

8.2.3 Add the lysis buffer in the volume recommended by the NA extraction kit used into the tube with precipitate.

8.2.4 Perform NA extraction according to NA extraction kit user manual.

8.2.5 To make a negative control sample perform p. 8.2.1 and 8.2.2 for tube with **STOR-M transport medium** which does not contain sample, or add 100 µL of STOR-M not containing biomaterial into lysis solution from the NA extraction kit.

The recommended kits for nucleic acids extraction:

- **PREP-RAPID DNA Extraction Kit** ("DNA-Technology Research & Production", LLC, "DNA-Technology TS", LLC, Russia);
- **PREP-GS and PREP-GS PLUS DNA Extraction Kits** ("DNA-Technology Research & Production", LLC, "DNA-Technology TS", LLC, Russia);
- **PREP-NA and PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kits** ("DNA-Technology Research & Production", LLC, "DNA-Technology TS", LLC, Russia);
- **PREP-MB RAPID DNA Extraction Kit** ("DNA-Technology Research & Production", LLC, Russia);
- **PREP-NA-S DNA/RNA Extraction Kit** ("DNA-Technology TS", LLC, Russia).

9. SPECIFICATIONS

The preservation of DNA in biomaterial samples taken into STOR-M (package S, 500) at different storage conditions

Biomaterial	Preservation of DNA (%)	
	28 days under temperatures from 18 °C to 25 °C	3 months under temperatures from 2 °C to 8 °C
scrapes/swabs of epithelial cells from urogenital tract	76.7	67.5
scrapes/swabs of epithelial cells from oropharynx	79.6	68.6
scrapes/swabs of epithelial cells from nasopharynx	64.9	67.6
scrapes/swabs of epithelial cells from conjunctiva of the eye	64.3	51.6
scrapes/swabs of epithelial cells from rectum	86.4	93.1
scrapes/swabs of epithelial cells from skin	83.6	67.1
Total (average, 95% CI)	75.9 (67.8-85.2) n=50	69.2 (57.8-79.4) n=50

The preservation of DNA in biomaterial samples taken into STOR-M (package S, 1000) at different storage conditions

Biomaterial	Preservation of DNA (%)	
	28 days under temperatures from 18 °C to 25 °C	3 months under temperatures from 2 °C to 8 °C
scrapes/swabs of epithelial cells from urogenital tract	No losses. The sample is suitable for PCR	No losses. The sample is suitable for PCR
Total (average, 95% CI)	n=25	n=25

The preservation of viral RNA in biomaterial samples taken into STOR-M at different storage conditions

Biomaterial	Preservation of RNA (%)	
	7 days under temperatures from 18 °C to 25 °C	28 days under temperatures from 2 °C to 8 °C
scrapes/swabs of epithelial cells from oropharynx (SARS-CoV-2)	No losses. The sample is suitable for RT-PCR	No losses. The sample is suitable for RT-PCR
scrapes/swabs of epithelial cells from nasopharynx (HRV)	No losses. The sample is suitable for RT-PCR	No losses. The sample is suitable for RT-PCR
Total (package S, 500)	n=7	n=9
Total (package S, 1000)	n=7	n=9

10. QUALITY CONTROL

“DNA-Technology Research&Production”, LLC declares that the abovementioned products meet the provision of the Regulation (EU) 2017/746 of the European parliament and of the Council of 5 April 2017. The quality control procedures performed in accordance with ISO 9001:2015 and ISO 13485:2016:

- observation of quality management in manufacturing of IVDR products;
- creation of values for customers;
- maintenance of the best service quality and customer management.

Contact our official representative in EU by quality issues of **STOR-M transport medium**.

Technical support:

E-mail: hotline@dna-technology.ru

<https://www.dna-technology.com>

Manufacturer: "DNA-Technology Research & Production", LLC,

142281, Russia, Moscow Region,

Protvino, Zheleznodorozhnaya Street, 20

Phone/fax: +7(495) 640.17.71

E-mail: info@dna-technology.com

<https://www.dna-technology.com>

Seller: “DNA-Technology” LLC,

117587, Russia, Moscow,

int. ter. Municipal District Chertanovo Severnoye,

Varshavskoye shosse, 125 Zh, building 5, floor 1, office 12;

Phone/fax: +7(495) 640.17.71

E-mail: info@dna-technology.com

<https://www.dna-technology.com>

Authorized representative in EU:

OBELIS S.A

Registered Address:

Bd. Général Wahis, 53

1030 Brussels, Belgium

Tel: +32.2.732.59.54

Fax: +32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

<http://www.obelis.net>

11. KEY TO SYMBOLS

	<i>In vitro</i> diagnostic medical device		Date of manufacture
	Temperature limit		Consult instructions for use
	Contains sufficient for <n> tests		Catalogue number
	Use-by date		Manufacturer
	Batch code		Version
	Authorized representative in the European Community		Non-sterile
	Do not re-use		



P-910-1/1EU

P-911-1/1EU



600-3.2025.02.13

ИНСТРУКЦИЯ

по применению транспортной среды для биопроб с муколитиком

СТОП-М

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2019/9453 от 24 декабря 2019 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

1	НАЗНАЧЕНИЕ	3
2	ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТНОЙ СРЕДЫ	4
2.1	Состав транспортной среды СТОП-М	4
2.2	Описание и принцип метода	4
2.3	Число анализируемых проб	4
2.4	Время подготовки к выделению ДНК	4
3	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
4	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
5	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	6
6	АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	7
6.1	Соскобы/мазки эпителиальных клеток	7
6.2	Транспортирование и хранение исследуемого материала	7
7	ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ БИОМАТЕРИАЛА ПЕРЕД ВЫДЕЛЕНИЕМ ДНК	8
7.1	Общие рекомендации	8
7.2	Подготовка к выделению ДНК	8
8	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	9
8.1	Транспортирование	9
8.2	Хранение	9
8.3	Указания по эксплуатации	9
9	УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	10
10	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	10
11	РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	10
12	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ	10
13	ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	11
14	АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	12

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Настоящая инструкция распространяется на транспортную среду для биопроб с муколитиком (СТОП-М) по ТУ 21.20.23-102-46482062-2019, далее по тексту транспортная среда СТОП-М.
- 1.2** Транспортная среда СТОП-М предназначена для транспортирования и хранения образцов биологического материала человека (соскобы/мазки эпителиальных клеток из урогенитального тракта, ротоглотки, носоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаза, кожи), в том числе содержащих примесь слизи, с целью последующего анализа ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- 1.3** Функциональное назначение изделия: Изделие является вспомогательным средством в клинической лабораторной диагностике и предназначено для транспортирования и хранения образцов биологического материала с целью последующего анализа ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- 1.4** Транспортная среда СТОП-М может быть использована в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.
- 1.5** Применение медицинского изделия не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.
- 1.6** Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, осуществляющий взятие и предобработку клинического материала, а также специалисты, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 1.7** Применять изделие строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСПОРТНОЙ СРЕДЫ

2.1 Состав транспортной среды СТОП-М

REF P-910-1/1, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Транспортная среда	Прозрачная бесцветная жидкость	100 пробирок	по 500 мкл

2.2 Описание и принцип метода

Транспортная среда СТОП-М представляет собой готовый к применению водно-солевой прозрачный, бесцветный раствор с добавлением консерванта, муколитика и ароматизатора. Консервант препятствует размножению неспецифических микроорганизмов, а муколитик воздействует на дисульфидные связи мукополисахаридов, тем самым разжижая слизь.

2.3 Число анализируемых проб

Транспортная среда СТОП-М предназначена для одноразового применения и рассчитана на 100 образцов.

2.4 Время подготовки к выделению ДНК

От 15 минут. Время подготовки к выделению ДНК зависит от количества образцов в постановке.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сохранность ДНК в образцах биоматериала при разных режимах хранения

Виды биоматериала	Сохранность ДНК (%)	
	28 дней при температуре от 18 °С до 25 °С	3 месяца при температуре от 2 °С до 8 °С
Соскоб эпителиальных клеток из уrogenитального тракта	76,7	67,5
Соскоб эпителиальных клеток из ротоглотки	79,6	68,6
Соскоб эпителиальных клеток из носа	64,9	67,6
Соскоб с конъюнктивы глаза	64,3	51,6
Соскоб эпителиальных клеток из прямой кишки	86,4	93,1
Соскоб эпителиальных клеток с кожи	83,6	67,1
Всего (среднее значение, 95% ДИ)	75,9 (67,8-85,2) n=50	69,2 (57,8-79,4) n=50

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Взятие биоматериала в транспортную среду СТОП-М должно проводиться в процедурных кабинетах, оборудованных в соответствии с требованиями, изложенными в разделе 1 СанПиН 2.1.3.2630-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность».

Подготовка к выделению ДНК и выделение ДНК из образцов биологического материала должны проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

К проведению исследования с использованием транспортной среды СТОП-М допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

Подготовку и проведение исследования с использованием транспортной среды СТОП-М следует проводить в боксах биологической безопасности II класса биологической защиты.

Дозаторы, используемые при работе с транспортной средой СТОП-М, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

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

При использовании набора в клинко-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Опасные компоненты в транспортной среде СТОП-М

Компонент изделия	СТОП-М
Транспортная среда	Азид натрия менее 0,1%

В состав транспортной среды входит **азид натрия** – консервант, в концентрации менее 0,1 %, что является безопасным для конечного пользователя (указание на риски: H210¹).

При использовании по назначению и соблюдению мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен.

При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не использовать транспортную среду СТОП-М:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов указанному в паспорте к транспортной среде СТОП-М;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов;
- по истечению срока годности набора.

Примечание - Транспортная среда СТОП-М **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, 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 транспортной средой СТОП-М требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса биологической защиты;
- микроцентрифуга-вортекс;
- центрифуга с RCF не ниже 13 000 x g;
- холодильник с морозильной камерой;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 100 до 1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- одноразовые стерильные зонды, тампоны, цитощетки для взятия биоматериала;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- комплект/набор реагентов для выделения ДНК.

¹ - H210- Лист данных о безопасности доступен по запросу.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Соскобы/мазки эпителиальных клеток

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься биологический материал, и закрывать ее перед работой со следующей пробиркой.

6.1.1 Перенесите соскоб/мазок эпителиальных клеток из урогенитального тракта, ротоглотки, носоглотки, прямой кишки, с конъюнктивы глаза, кожи с помощью одноразового стерильного зонда в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с транспортной средой СТОП-М, тщательно и аккуратно ополосните зонд, избегая разбрызгивания жидкости.

6.1.2 Извлеките зонд, прижимая его к стенке пробирки, и удалите избыток жидкости с зонда о стенки пробирки. Использованный зонд утилизируйте.

Примечание – Перед получением соскоба эпителиальных клеток 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.

6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала

6.2.1 Транспортировать и хранить пробирки с образцами биологического материала, помещенными в транспортную среду СТОП-М, до начала исследования следует при температуре от 2 °С до 8 °С не более 3-х месяцев.

6.2.2 Допускается транспортирование и хранение пробирок с образцами биологического материала, помещенными в транспортную среду СТОП-М, при температуре от 18 °С до 25 °С не более 28 суток.

7 ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ БИОМАТЕРИАЛА ПЕРЕД ВЫДЕЛЕНИЕМ ДНК

7.1 Общие рекомендации

- 7.1.1 Используйте одноразовые наконечники с аэрозольным барьером, свободные от РНКаз и ДНКаз.
- 7.1.2 При добавлении раствора в пробу, содержащую биологический материал, аккуратно вносите жидкости, не касаясь стенок пробирок. При касании к стенке пробирки смените наконечник. Наконечник следует менять при каждом удалении раствора из образца.
- 7.1.3 Для предотвращения контаминации открывайте крышку только той пробирки, в которую будет вноситься образец/реактив или удаляться надосадочная жидкость, и закрывайте ее перед работой со следующей пробиркой.

7.2 Подготовка к выделению ДНК

- 7.2.1 Центрифугируйте пробирку с биоматериалом в транспортной среде СТОР-М при 13 000 x g в течение 10 мин.
- 7.2.2 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

Примечание – При использовании протоколов исследования, не предполагающих предварительного центрифугирования биоматериала, пп. 7.2.1 и 7.2.2 не выполняются.

- 7.2.3 Добавьте к осадку необходимое количество лизирующего раствора из состава применяемого комплекта/набора реагентов для выделения ДНК согласно прилагаемой к данному комплекту/набору инструкции.
- 7.2.4 Произведите выделение ДНК в соответствии с используемым методом.
- 7.2.5 Для формирования отрицательного контрольного образца следует выполнить пп.7.2.1 и 7.2.2 для пробирки с транспортной средой СТОР-М, не содержащей биоматериал, или добавить 100 мкл транспортной среды СТОР-М, не содержащей биоматериала в соответствующую пробирку с лизирующим раствором из состава применяемого комплекта/набора реагентов для выделения ДНК.

Транспортная среда для биопроб с муколитиком (СТОР-М) совместима со всеми методиками для выделения ДНК.

Рекомендуемые наборы для выделения нуклеиновых кислот:

- Комплект реагентов для выделения ДНК (ПРОБА-РАПИД) по ТУ 9398-015-46482062-2008 (ООО «НПО ДНК-Технология», ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), РУ № ФСР 2008/02939 от 15.06.2015 г.;

- Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС (ООО «НПО ДНК-Технология», ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), РУ № ФСР 2010/08696 от 25.10.2016 г.;
- Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, ООО «ДНК-Технология ТС»), РУ № ФСР 2010/08867 от 13.10.2016 г.;
- Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-МЧ) по ТУ 9398-088-46482062-2016» (ООО «ДНК-Технология ТС»), РУ № РЗН 2017/5753 от 22.05.2017 г.

8 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

8.1 Транспортирование

- 8.1.1 Транспортирование транспортной среды СТОП-М осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 25 °С не более 14 суток.
- 8.1.2 Транспортная среда СТОП-М, транспортированная с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

8.2 Хранение

- 8.2.1 Транспортную среду СТОП-М следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.
- 8.2.2 Транспортная среда СТОП-М, хранившаяся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

8.3 Указания по эксплуатации

- 8.3.1 Транспортная среда СТОП-М должна применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению транспортной среды.
- 8.3.2 После вскрытия упаковки транспортную среду СТОП-М следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.
- 8.3.3 Транспортная среда СТОП-М с истекшим сроком годности применению не подлежит.

9 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 9.1** При использовании транспортной среды СТОП-М в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- 9.2** Транспортная среда СТОП-М, пришедшая в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, и неиспользованные реактивы относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.
- 9.3** Упаковка транспортной среды СТОП-М (коробки, грипперы) после использования по назначению относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

10 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 10.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие транспортной среды СТОП-М требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 10.2** Срок годности транспортной среды СТОП-М - 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

11 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Транспортная среда СТОП-М предназначена для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

12 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ

	Медицинское изделие для диагностики in vitro		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон		Каталожный номер
	Количество тестов		Адрес производителя
	Годен до		Серия набора
	Дата производства		

13 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

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

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

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

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

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

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

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

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании 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.

14 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 медицинской молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

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

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

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

Рекламации по вопросам качества транспортной среды СТОП-М следует направлять по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12, тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки:

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

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

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Номер 497-1
2021-07-19



670-4 2025-06-20



For professional use only

PREP-GS DNA Extraction Kit**PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit****PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit****INSTRUCTION FOR USE**

OBELIS S.A

Registered Address:

Bd. Général Wahis, 53

1030 Brussels, Belgium

Tel: +32.2.732.59.54

Fax: +32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net<http://www.obelis.net>

"DNA-Technology Research & Production", LLC,

142281, Russia,

Moscow Region, Protvino,

Zheleznodorozhnaya Street, 20

Phone/fax: +7(495) 640.17.71

E-mail: info@dna-technology.com<https://www.dna-technology.com>

Customer service department

E-mail: hotline@dna-technology.ru

P-003/1EU

P-003/2EU

P-023/4EU



670-4.2025.06.20

TABLE OF CONTENTS

1. INTENDED USE	3
2. METHOD	3
3. CONTENT	3
4. REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED	4
5. TRANSPORT AND STORAGE CONDITIONS	5
6. WARNINGS AND PRECAUTIONS	6
7. SAMPLES	7
8. PROCEDURE	10
9. QUALITY CONTROL	12
10. KEY TO SYMBOLS	13

1. INTENDED USE

The **PREP-GS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** are intended for DNA extraction from biological materials (see Table 1) for further analysis by polymerase chain reaction (PCR). In the **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** the total volume of purified DNA is larger (300 µL) comparing to standard **PREP-GS DNA Extraction Kit** (100 µL) for more PCR tests. The **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit** is intended for DNA extraction from whole peripheral blood for further DNA genetic testing by PCR.

Table 1. Biological material for DNA extraction by **PREP-GS DNA Extraction Kit**, **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit**

Extraction Kit	PREP-GS DNA Extraction Kit	PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit	PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit
Biological material	Phlegm, saliva, urine, ejaculate, prostate fluid, cerebrospinal fluid, milk serum, minced tissue, epithelial scrapes from posterior pharyngeal wall, urethra, cervical canal, posterior vaginal vault, biological samples with PCR inhibitors		Peripheral blood

This medical device is an auxiliary agent in clinical laboratory diagnostics.

The application of the kits does not depend on population and demographic aspects. There are no contradictions for use of the **PREP-GS DNA Extraction Kit**, **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit**.

The **PREP-GS DNA Extraction Kit**, **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit** can be used in clinical and diagnostic laboratories of medical institutions and research practice.

Potential users: personnel qualified in molecular diagnostics methods and working in the clinical and diagnostic laboratory.

It is necessary to apply the kits only as directed in this instruction for use.

2. METHOD

The **PREP-GS DNA Extraction Kit**, **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit** are based on nucleic acids release under the action of a chaotropic agent, followed by precipitation and purification of nucleic acids from impurities.

3. CONTENT

The detailed description of content is represented in Tables 2-4.

Table 2. The **PREP-GS DNA Extraction Kit** content, for P-003/1EU

Reagent	Description	Total volume	Amount
Lysis buffer	Light blue slightly foaming liquid	15 mL	1 vial
Sorbent	Brown suspension	2.0 mL (1.0 mL in each tube)	2 tubes
Wash solution No. 1	Colorless transparent liquid	20 mL	1 vial
Wash solution No. 2	Colorless transparent liquid	20 mL	1 vial
Wash solution No. 3	Colorless transparent liquid	20 mL	1 vial
Elution buffer	Colorless transparent liquid	10 mL	1 vial

Table 3. The **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** content, for P-003/2EU

Reagent	Description	Total volume	Amount
Lysis buffer	Light blue slightly foaming liquid	7.5 mL	1 vial
Sorbent	Brown suspension	1.0 mL	1 tube
Wash solution No. 1	Colorless transparent liquid	10 mL	1 vial
Wash solution No. 2	Colorless transparent liquid	10 mL	1 vial
Wash solution No. 3	Colorless transparent liquid	10 mL	1 vial
Elution buffer	Colorless transparent liquid	15 mL	1 vial

Table 4. The **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit** content, for P-023/4EU

Reagent	Description	Total volume	Amount
Lysis buffer	Light blue slightly foaming liquid	7.2 mL	1 vial
Sorbent	Brown suspension	960 µL	1 tube
Wash solution No. 1	Colorless transparent liquid	19.2 mL	1 vial
Wash solution No. 2	Colorless transparent liquid	9.6 mL	1 vial
Wash solution No. 3	Colorless transparent liquid	9.6 mL	1 vial
Elution buffer	Colorless transparent liquid	14.4 mL	1 vial

All components are ready to use and do not require additional preparation for operation.

The kits are designed for 100 analyzed samples (including negative controls) for **PREP-GS DNA Extraction Kit**, 50 analyzed samples (including negative controls) for **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and 48 analyzed samples (including negative controls) for **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit**.

4. REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

4.1. Specimen collection

- Sterile single use swabs and sterile containers to collect clinical material;
- Sterile tubes containing transport media: “DNA-Technology” made **STOR-M** ([REF](#) P-910-1/1EU) or **STOR-F** ([REF](#) P-901-1/1EU, P-901-N/1EU, P-901-R/1EU) or equivalent or physiological saline solution or sterile PBS for the transportation of the sample;
- For blood collection: 2.0 or 4.0 mL Vacuette blood collection tubes with anticoagulant, for example, salt of EDTA at a final concentration of 2.0 mg/mL or sodium citrate anticoagulant.

Please use only salt of EDTA or sodium citrate as an anticoagulant, since other substances can provide PCR inhibition.

4.2. DNA extraction

- Biological safety cabinet class II;
- Refrigerator;
- Vortex mixer;
- High speed centrifuge (RCF 16000 x g);
- Solid-state thermostat (temperature range 65-98 °C);

- Tube rack for 1.5 mL tubes;
- 1.5 mL tubes;
- Physiological saline solution 0.9% NaCl (Sterile);
- Electric laboratory aspirator with trap flask for the removal of supernatant;
- Single channel pipettes (dispensers covering 20-1000 µL volume range);
- RNase and DNase free filtered pipette tips (volume 200 µL, 1000 µL);
- RNase and DNase free non-filtered pipette tips for aspirator with trap flask;
- Container for used pipette tips, tubes and other consumables;
- Powder-free surgical gloves;
- Disinfectant solution.

When extracting DNA from phlegm (method 1):

- 10% trisodium phosphate x 12H₂O;
- 1.0M HCl solution;
- 5.0% chloramines solution;
- distilled water.

When extracting DNA from phlegm (method 2):

- mucolysin.

5. TRANSPORT AND STORAGE CONDITIONS

Expiry date – 12 months from the date of production.

The **PREP-GS DNA Extraction Kit**, **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit** must be transported in thermoboxes with ice packs by all types of roofed transport at temperatures inside the thermoboxes corresponding to storage conditions of the kit components.

It is allowed to transport the kit in thermoboxes with ice packs by all types of roofed transport at temperatures inside the thermoboxes from 2 °C to 25 °C, but for no longer than 5 days.

Kits transported with violation of temperature conditions must not be used.

All components of the **PREP-GS DNA Extraction Kit**, **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit** must be stored at temperatures from 2 °C to 8 °C and out of light over the storage period.

The excessive temperature can be detrimental to product performance.

Shelf-life of the kit following the first opening of the primary container:

- sorbent, wash solution No. 2, wash solution No. 3 and elution buffer must be stored at temperatures from 2 °C to 8 °C during the storage period;
- lysis buffer and wash solution No. 1 must be stored at temperatures from 2 °C to 8 °C and out of light during the storage period.

The kit stored under undue regime must not be used.

An expired **PREP-GS DNA Extraction Kit**, **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit** must not be used.

We strongly recommend to follow the given instructions in order to obtain accurate and reliable results.

The conformity of the **PREP-GS DNA Extraction Kit**, **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit** to the prescribed technical requirements is subject to compliance of storage, transportation and handling conditions recommended by manufacturer.

6. WARNINGS AND PRECAUTIONS

Only personnel trained in the methods of molecular diagnostics and the rules of work in the clinical and diagnostic laboratory are allowed to work with the kit.

Handle and dispose all biological samples, reagents and materials used to carry out the assay as if they were able to transmit infective agents. The samples must be exclusively employed for certain type of analysis. Samples must be handled under a laminar flow hood. Tubes containing different samples must never be opened at the same time. Pipettes used to handle samples must be exclusively employed for this specific purpose. The pipettes must be of the positive dispensation type or be used with aerosol filter tips. The tips employed must be sterile, free from the DNases and RNases, free from DNA and RNA. The reagents must be handled under a laminar flow hood. The reagents required for amplification must be prepared in such a way that they can be used in a single session. Pipettes used to handle reagents must be exclusively employed for this specific purpose. The pipettes must be of the positive dispensation type or be used with aerosol filter tips. The tips employed must be sterile, free from the DNases and RNases, free from DNA and RNA. Avoid direct contact with the biological samples reagents and materials used to carry out the assay. Wear powder-free surgical gloves. Wear protective clothing (work clothes and personal protective equipment) working with microorganisms classified as particularly pathogenic. The protective clothing and personal protective equipment must comply with the work to be performed and health and safety requirements. Avoid producing spills or aerosol. Any material being exposed to biological samples must be treated for at least 30 minutes with disinfecting solution or autoclaved for 1 hour at 121 °C before disposal.

Molecular biology procedures, such as nucleic acids extraction, PCR-amplification and detection require qualified staff to avoid the risk of erroneous results, especially due to the degradation of nucleic acids contained in the samples or sample contamination by amplification products.

All the liquid solutions are designed for single use and can not be used more than once in amplification reactions. Plastic tubes do not contain phthalates. Do not breathe gas/fumes/vapor/spray produced by the components of the kit. Do not eat/drink components of the kit. Avoid contact with eyes. Only use the reagents provided in the kit and those recommended by manufacturer. Do not mix reagents from different batches. Do not use reagents from third party manufacturers' kits. All laboratory equipment, including pipettes, test tube racks, laboratory glassware, lab coats, bouffant caps, etc., as well as reagents should be strictly stationary. It is not allowed to move them from one room to another. Equip separate areas for the extraction/preparation of amplification reactions and for the amplification/detection of amplification products. Never introduce an amplification product in the area designed for extraction/preparation of amplification reactions. Wear lab coats, gloves and tools, which are exclusively employed for the extraction/preparation of the amplification reaction and for the amplification/detection of the amplification products. Never transfer lab coats, gloves and tools from the area designed for amplification/detection of the amplification products to the area designed for extraction/preparation of amplification reactions. Remove waste materials (tubes, tips) only in a special closed container containing a disinfectant solution. Work surfaces, as well as rooms where NA extraction and PCR are performed, must be irradiated with bactericidal irradiators for 30 minutes before and after the work.

Waste materials are disposed of in accordance with local and national standards. All surfaces in the laboratory (work tables, test tube racks, equipment, etc.) must be treated daily with disinfecting solution.

Emergency actions

Eye Contact: If any component of this kit enters the eyes, wash eyes gently under potable running water for 15 minutes or longer, making sure that the eyelids are held open. If pain or irritation occurs, obtain medical attention.

Skin Contact: If any component of this kit contacts the skin and causes discomfort, remove any contaminated clothing. Wash affected area with plenty of soap and water. If pain or irritation occurs, obtain medical attention.

Ingestion: If any component of this kit is ingested, wash mouth out with water. If irritation or discomfort occurs, obtain medical attention.

Do not use the kit:

- When the transportation and storage conditions are breached;
- When the reagents' appearance does not respond to the kit passport;
- When the kit components packaging is breached;
- After the expiry date provided.

Significant health effects are **NOT** anticipated from routine use of this kit when adhering to the instructions listed in the current manual.

7. SAMPLES

The **PREP-GS DNA Extraction Kit**, **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit** is designed to extract DNA from a wide variety of biological sample types, such as saliva, phlegm, milk, urine, ejaculate, prostate fluid, cerebrospinal fluid, scrapes of epithelial cells from the posterior pharyngeal wall, urethra, cervical canal, posterior vaginal vault, etc. for **PREP-GS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kits** and peripheral whole blood for **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit**.

Sample collection

Blood sampling

Peripheral blood sampling is carried out in vacuum plastic tube. It may be 2.0 or 4.0 mL Vacuette blood collection tubes with anticoagulant, for example salt of EDTA at a final concentration of 2.0 mg/mL or sodium citrate anticoagulant. After taking the material, it is necessary to mix the blood with anticoagulant turning the tube 2 – 3 times.

WARNING! It is not allowed to use heparin as an anticoagulant.

Phlegm sampling

Sample taking is made in amount no less than 1.0 mL into single-use graduated sterile flasks with wide neck and screwing caps with volume no less than 50 mL.

After sample collection, flask is tightly screwed and marked.

Epithelial scrapes sampling

Procedural limitations for genitourinary smears sampling - local application of medicines, vaginal ultrasound less than 24 hours before the procedure.

Sampling procedure is carried out using special sterile disposable instruments – urogenital swabs, cytobrushes or tampons, depending on the source of clinical material in accordance with established procedures.

WARNING! In case of pregnancy the use of cytobrushes for genitourinary smears sampling is contraindicated.

The taking of the scrapes is carried out:

- in plastic 1.5 mL tubes with 500 µL of a sterile physiological solution;
- in tubes with transport medium intended by the manufacturer for transportation and storage of samples for PCR.

WARNING! Remove mucus with sterile cotton swab before taking scrape from cervical channel.

Order of taking:

- 1 Open the tube.
- 2 Scrape epithelial cells from the corresponding biotope (posterior pharyngeal wall, urethra, cervical canal, posterior vaginal vault, etc.) with a sterile swab.
- 3 Put the swab into the tube with transport medium and rinse it thoroughly. Avoid spraying of solution.
- 4 Remove swab from solution, press it to the wall of tube and squeeze the rest of the liquid. Throw out the swab.
- 5 Close the tube tightly and mark it.

Urine sampling

Take the portion (approximately 50 mL) of the first-void urine to sterile container and close it tightly.

Saliva, cerebrospinal fluid, synovial fluid sampling

Collect the saliva, cerebrospinal fluid, synovial fluid (approximately 500 µL) to the sterile container and close it tightly.

Ejaculate, prostate fluid sampling

Put 100 µL of the liquid sample into the 1.5 mL tube with transport medium (or alternatively with 500 µL of sterile buffered saline).

Milk sampling

Collect the sample into the sterile container and close it tightly.

Milk collection period must not exceed 24 hours. Keep at temperatures from 2 °C to 8 °C during the collection period.

Transportation and storage of the samples

Samples may be transported and stored at temperatures from 2 °C to 8 °C for no more than 24 h. When it is impossible to deliver the material in the laboratory during the day, a one-time freezing of the material is allowed. The frozen material is allowed to be stored at temperatures from minus 18 °C to minus 22 °C for one month.

In case of usage transport media, biological material samples are transported and stored according to the instruction for the transport medium used intended for subsequent sample analysis by PCR.

Sample preparation

Preparation of the phlegm:

Method 1:

1. Put approximately 500 µL of biological sample into sterile 1.5 mL tube and close it tightly.
2. Add to the sample an equal volume of 10% triple-substituted sodium phosphate $\times 12\text{H}_2\text{O}$ and mix intensively.
3. Incubate the mixture at 37 °C for 18–24 hours, then neutralize with 1M HCl (down to pH 6.8–7.4).
4. Centrifuge the tube at RCF(g) 100 for 20 minutes.
5. Take out the supernatant into the 5.0% solution of chloramine for disinfection.
6. Add 500 µL of distilled water to precipitate, mix by pipetting and put to the new 1.5 mL tube.
7. Centrifuge the tube at RCF(g) 16000 for 10 minutes.
8. Remove the supernatant, leaving approximately 100 µL (precipitate+liquid fraction) in the tube.

Method 2:

1. Add mucolysin to the sampling container in the 5:1 ratio (5 parts of mucolysin to 1 part of phlegm), referring to container calibrations.
2. Close the lid of the container, mix the content and incubate for 20–30 minutes at room temperature, shake the container every 2-3 minutes.

The samples are ready for DNA extraction.

Storage of processed phlegm in a container is accepted at temperatures from 2 °C to 8 °C for one day or at temperatures not above minus 16 °C for along time (in case of repeated DNA extraction necessity).

Preparation of the epithelial scrapes:

1. Centrifuge the tube at RCF(g) 16000 for 10 minutes.
2. Remove the supernatant, leaving approximately 50 µL (precipitate+liquid fraction) in the tube.

The samples are ready for DNA extraction.

Preparation of the urine:

1. Transfer 1.0 mL of the sample to the 1.5 mL tube.
2. Centrifuge the tube at RCF(g) 16000 for 10 minutes.
3. Remove the supernatant completely.
4. Add 1.0 mL of sterile buffered saline to the precipitate.
5. Centrifuge the tube at RCF(g) 16000 for 10 minutes.
6. Remove the supernatant, leaving approximately 50 µL (precipitate+liquid fraction) in the tube.

The samples are ready for DNA extraction.

Preparation of the saliva, cerebrospinal fluid, synovial fluid:

1. Transfer 500 µL of the sample to the 1.5 mL tube.
2. Centrifuge the tube at RCF(g) 16000 for 10 minutes.
3. Remove the supernatant, leaving approximately 50 µL (precipitate+liquid fraction).
4. Add 500 µL of sterile buffered saline to the precipitate.
5. Centrifuge the tube at RCF(g) 16000 for 10 minutes.
6. Remove the supernatant, leaving approximately 50 µL (precipitate+liquid fraction).

The samples are ready for DNA extraction.

Preparation of the ejaculate, prostate fluid:

1. Vortex the tubes with samples for 5-10 seconds.
2. Centrifuge the tube at RCF(g) 16000 for 10 minutes.
3. Remove the supernatant, leaving approximately 50 µL (precipitate+liquid fraction) in the tube.

The samples are ready for DNA extraction.

Preparation of the milk:

1. Mix thoroughly and put 1.0 mL of the sample into the 1.5 mL tube.

The samples are ready for DNA extraction.

8. PROCEDURE

DNA extraction from biological material

WARNING! Independently of DNA extraction kit used, a negative control sample should go through all stages of DNA extraction. Physiological saline solution can be used as a negative control in volumes as indicated.

Assay procedure:

WARNING! The lysis buffer and wash solution No. 1 can form the precipitate. Dissolve it at 50 °C for 15-20 minutes prior to use.

8.1 Mark the required number of 1.5 mL tubes for each test sample and negative control (C-).

Example: to test 5 samples, mark 5 tubes for samples and 1 tube for "C-". The resulting number of tubes is 6.

WARNING! For pre-processed samples with obtaining pellet and supernatant (phlegm method 1, saliva, cerebrospinal fluid, urine, ejaculate, prostatic fluid and epithelial scrapes) tubes with 50 µL of material prepared for testing must be marked.

8.2 Prepare the mixture of lysis buffer and sorbent. Add into the one tube:

- 150 x (N+1) µL of lysis buffer,
 - 20 x (N+1) µL of preliminarily resuspended sorbent,
- N is a quantity of the samples to be tested taking to account "C-".

8.3 Add 170 µL of prepared mixture to marked tubes. Close the tubes.

WARNING! Always open the tube that you are working with, and close it after handling. It is not allowed to work simultaneously with several tubes with open caps.

8.4 Add 50 µL of prepared sample (**PREP-GS**, **PREP-GS PLUS** kits) or 100 µL of peripheral blood (**PREP-GS Genetics** kit) into the marked tubes. Do not add samples to the "C-" tube and tubes with pre-processed samples with obtaining pellet and supernatant (phlegm method 1, saliva, cerebrospinal fluid, urine, ejaculate, prostatic fluid and epithelial scrapes) (see Table 5).

8.5 Add 50 µL (**PREP-GS**, **PREP-GS PLUS** kits) or 100 µL (**PREP-GS Genetics** kit) of specimen transport medium or sterile buffered saline to "C-" tube (see Table 5).

8.6 Close the tubes tightly and vortex them for 3–5 seconds.

8.7 Incubate the tubes at 50 °C for 20 minutes (**PREP-GS**, **PREP-GS PLUS** kits) or 10 minutes (**PREP-GS Genetics** kit) (see Table 5).

8.8 Centrifuge the tubes at RCF(g) 16000 for 1 minute.

8.9 Remove the supernatant completely avoiding contact of the pipette tip with the precipitate. Use new tip for each sample.

8.10 Add 200 µL (**PREP-GS**, **PREP-GS PLUS** kits) or 400 µL (**PREP-GS Genetics** kit) of wash solution No. 1, close tubes tightly and vortex them for 3–5 seconds (see Table 5).

8.11 Centrifuge the tubes at RCF(g) 16000 for 1 minute.

8.12 Remove the supernatant completely avoiding contact of the pipette tip with the precipitate. Use new tip for each sample.

- 8.13 Add 200 µL of wash solution No. 2, close tubes tightly and vortex them for 3–5 seconds.
- 8.14 Centrifuge the tubes at RCF(g) 16000 for 1 minute.
- 8.15 Remove the supernatant completely avoiding contact of the pipette tip with the precipitate. Use new tip for each sample.
- 8.16 Add 200 µL of wash solution No. 3, close tubes tightly and vortex them for 3–5 seconds.
- 8.17 Centrifuge the tubes at RCF(g) 16000 for 1 minute.
- 8.18 Remove the supernatant completely avoiding contact of the pipette tip with the precipitate. Use new tip for each sample.
- 8.19 Open the tubes and dry precipitate by incubation at 50 °C for 5 minutes.
- 8.20 Add to precipitate 100 µL (**PREP-GS** kit) or 300 µL (**PREP-GS PLUS** or **PREP-GS Genetics** kits) of elution buffer, close the tubes tightly and vortex them for 5-10 seconds.
- 8.21 Incubate tubes at 50 °C for 5 minutes (see Table 5).
- 8.22 Centrifuge the tubes at RCF(g) 16000 for 1 minute. Transfer the supernatant into the new tube if sample is to be stored for more than 7 days.

Supernatant containing extracted DNA is ready for adding to PCR-mix.

The obtained DNA sample can be stored at temperatures from 2 °C to 8 °C for no longer than 7 days. Before using the DNA sample for PCR steps, incubate tubes at 50 °C for 5 minutes and then centrifuge the tubes at RCF(g) 16000 for 1 minute. DNA preparation can be stored at temperatures from minus 18 °C to minus 22 °C for no longer than 6 months for **PREP-GS**, **PREP-GS PLUS** kits and no longer than 1 year for **PREP-GS Genetics** kit (see Table 5).

Table 5.

Extraction kit	PREP-GS	PREP-GS PLUS	PREP-GS Genetics
Volume of analyzed sample and negative control sample required for DNA extraction procedure	50 µL		100 µL
Time of incubation in lysis buffer	20 min		10 min
Volume of wash solution No. 1 required for 1 sample extraction	200 µL		400 µL
Volume of elution buffer required for 1 sample extraction	100 µL	300 µL	
Storage period of purified DNA at temperatures from minus 18 °C to minus 22 °C	up to 6 months		up to 1 year

9. QUALITY CONTROL

“DNA-Technology Research&Production”, LLC declares that the abovementioned products meet the provision of the Regulation (EU) 2017/746 of the European parliament and of the Council of 5 April 2017. The quality control procedures performed in accordance with ISO 9001:2015 and ISO 13485:2016:

- observation of quality management in manufacturing of IVDD products;
- creation of values for customers;
- maintenance of the best service quality and customer management.

Contact our official representative in EU by quality issues of **PREP-GS DNA Extraction Kit**, **PREP-GS PLUS DNA Extraction Kit** and **PREP-GS Genetics DNA Extraction Kit**.

Technical support:

E-mail: hotline@dna-technology.ru

<https://www.dna-technology.com>

Manufacturer: "DNA-Technology Research & Production", LLC,

142281, Russia, Moscow Region,

Protvino, Zheleznodorozhnaya Street, 20

Phone/fax: +7(495) 640.17.71

E-mail: info@dna-technology.com

<https://www.dna-technology.com>

Seller: "DNA-Technology" LLC,

117587, Russia, Moscow,

int. ter. Municipal District Chertanovo Severnoye,

Varshavskoye shosse, 125 Zh, building 5, floor 1, office 12

Phone/fax: +7(495) 640.17.71

E-mail: info@dna-technology.com

<https://www.dna-technology.com>

Authorized representative in EU:

OBELIS S.A

Registered Address:

Bd. Général Wahis, 53

1030 Brussels, Belgium

Tel: +32.2.732.59.54

Fax: +32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

<http://www.obelis.net>

10. KEY TO SYMBOLS

	<i>In vitro</i> diagnostic medical device		Date of manufacture
	Temperature limit		Consult instructions for use
	Contains sufficient for <n> tests		Catalogue number
	Use-by date		Manufacturer
	Batch code		Keep away from sunlight
	Non-sterile		Version
	Authorized representative in the European Community		Caution!

REF

P-003/1EU

P-003/2EU

P-023/4EU

VER

670-4.2025.06.20



180-7 2024-07-03

Комплект реагентов для выделения ДНК

Формы комплектации:

ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1** Настоящая инструкция распространяется на комплект реагентов для выделения ДНК, далее по тексту комплект реагентов.
- 1.2** Комплект реагентов для выделения ДНК предназначен для получения препарата ДНК из биологического материала (таблица 1).
Комплектация ПРОБА-ГС-ПЛЮС предназначена для получения большего объема ДНК (300 мкл) по сравнению с комплектацией ПРОБА-ГС (100 мкл) с целью проведения в дальнейшем большего числа ПЦР-исследований.
Комплектация ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА предназначена для получения ДНК с целью последующего проведения генетических исследований выделенной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.
- 1.3** Комплект реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав комплекта реагентов

Компонент	Количество					
	ПРОБА-ГС		ПРОБА-ГС-ПЛЮС		ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА	
• Лизирующий раствор	15 мл	1 флакон	7,5 мл	1 флакон	7,2 мл	1 флакон
• Сорбент	1,0 мл	2 пробирки	1,0 мл	1 пробирка	960 мкл	1 пробирка
• Промывочный раствор №1	20 мл	1 флакон	10 мл	1 флакон	19,2 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №2	20 мл	1 флакон	10 мл	1 флакон	9,6 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №3	20 мл	1 флакон	10 мл	1 флакон	9,6 мл	1 флакон
• Элюирующий раствор	10 мл	1 флакон	15 мл	1 флакон	14,4 мл	1 флакон

- 2.2** **Количество исследуемых образцов.** Комплект реагентов предназначен для одnorазового применения и рассчитан на выделение ДНК из 100/50/48 анализируемых образцов (включая отрицательные контрольные образцы) (таблица 1).

Таблица 1

Комплектация	ПРОБА-ГС	ПРОБА-ГС-ПЛЮС	ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА
Каталожный номер	REF P-003/1	REF P-003/2	REF P-023/4
Материал для исследования	Мокрота, плазма крови, слюна, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор, молочная сыворотка, измельченные ткани, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, а также материал, в котором присутствует значительное количество ингибирующих примесей		Периферическая кровь
Количество определений	100	50	48

- 2.3** **Время проведения выделения ДНК** – один час.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Подготовка к выделению ДНК и выделение ДНК из образцов биологического материала должны проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением требований ГОСТ Р 52905-2007, методиками 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». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

При использовании комплекта 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».

Примечание – Комплект реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

4 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

При работе с комплектом реагентов для выделения ДНК требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 65 °C до 98 °C;
- центрифуга с RCF(g) не ниже 12000;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- дозаторы электронные с адаптером и/или дозаторы механические переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда для пробирок и/или физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

При выделении НК¹ из плазмы:

- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА или цитратом натрия.

При выделении НК из мокроты (способ 1):

- 10% раствор трёхзамещенного фосфорнокислого натрия x 12H₂O;
- 1М раствор HCl;
- 5% раствор хлорамина;
- вода дистиллированная.

При выделении НК из мокроты (способ 2): муколизин.

5 ВЗЯТИЕ И ПОДГОТОВКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

5.1 Периферическая кровь

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

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

5.2 Плазма крови

5.2.1 Центрифугируйте пробирки с кровью при RCF(g) 900 в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).

5.2.2 После центрифугирования отберите полуавтоматическим дозатором верхнюю фракцию (плазма) и перенесите в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

5.3 Мокрота

5.3.1 Способ 1

5.3.1.1 Примерно 500 мкл биологического материала перенесите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

5.3.1.2 Добавьте к пробе мокроты равный объём 10% трёхзамещенного фосфорнокислого натрия x 12H₂O, плотно закройте крышкой и интенсивно встряхните.

5.3.1.3 Смесь инкубируйте при температуре 37 °C в течение 18-24 часов, затем нейтрализуйте 1М HCl до pH 6,8-7,4.

5.3.1.4 Центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 20 мин.

5.3.1.5 Слейте надосадочную жидкость в ёмкость с 5% раствором хлорамина для обеззараживания.

5.3.1.6 Добавьте к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешайте пипетированием и перенесите в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

5.3.1.7 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

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

5.3.2 Способ 2

5.3.2.1 В контейнер с образцом добавьте муколизин в соотношении 5:1 (пять частей муколизина к одной части мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера.

5.3.2.2 Закройте крышку контейнера, встряхните содержимое и инкубируйте 20-30 мин при комнатной температуре, каждые 2-3 мин встряхивая контейнер.

5.4 Слюна, ликвор, синовиальная жидкость

5.4.1 Слюну, ликвор, синовиальную жидкость (примерно 500 мкл) соберите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

5.4.2 Перенесите 500 мкл материала в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

5.4.3 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.4.4 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок+жидкая фракция).

5.4.5 Добавьте к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного.

5.4.6 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.4.7 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок+жидкая фракция).

5.5 Моча

5.5.1 Порцию утренней мочи (примерно 50 мл) соберите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

5.5.2 Перенесите 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

5.5.3 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.5.4 Наиболее полно удалите надосадочную жидкость.

5.5.5 Добавьте к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного.

5.5.6 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.5.7 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок+жидкая фракция).

¹ - НК – нуклеиновые кислоты

- 5.6** Сперма, секрет предстательной железы
- 5.6.1** Перенесите 20-30 мкл жидкого материала пипеткой в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с консервантом (или с 500 мкл физиологического раствора стерильного).
- 5.6.2** Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.
- 5.6.3** Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок+жидкая фракция).
- 5.7** Соскобы эпителиальных клеток
- 5.7.1** Перенесите соскоб эпителиальных клеток (с задней стенки глотки, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала и др.) с помощью одноразового стерильного зонда в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с транспортной средой (или с 500 мкл физиологического раствора стерильного), аккуратно перемешайте. Извлеките зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки. Пробирку плотно закройте.
- 5.7.2** Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.
- 5.7.3** Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок+жидкая фракция). Полученный материал готов для выделения ДНК.

6 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Примечание – В лизирующем растворе и в промывочном растворе №1 допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 50 °С в течение 15-20 мин.

- 6.1** Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца (К-) по одной пробирке объемом 1,5 мл.
- Примечание** – Для образцов, прошедших предобработку с получением осадка и надосадочной жидкости (см. 5: мокрота – способ 1, слюна, моча, ливор, сперма, секрет предстательной железы, соскобы эпителиальных клеток), маркируются пробирки с подготовленным для исследования материалом в объеме 50 мкл.
- 6.2** Приготовьте смесь лизирующего раствора с сорбентом. Смешайте в отдельной пробирке:
- 150 x (N+1) мкл лизирующего раствора;
 - 20 x (N+1) предварительно ресуспендированного сорбента,
- где N + 1 – количество анализируемых образцов с учетом «К-» (N) с запасом на один образец.
- 6.3** Добавьте в каждую пробирку по 170 мкл полученной смеси.
- 6.4** Внесите по 50 мкл подготовленного биоматериала (комплектации ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС) или по 100 мкл периферической крови (комплектация ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА) в пробирки для исследуемых образцов (за исключением пробирок с образцами, прошедшими предобработку с получением осадка (см. 6.1), и пробирки «К-») (таблица 2).
- 6.5** В пробирку, маркированную «К-», внесите 50 мкл (комплектации ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС) или 100 мкл (комплектация ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА) транспортной среды или физиологического раствора стерильного (таблица 2). Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3-5 с.
- 6.6** Термостатируйте пробирки в течение 20 мин (комплектации ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС) или 10 мин (комплектация ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА) при 50 °С (таблица 2).
- 6.7** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты.
- 6.8** Не задеявая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.9** Добавьте к осадку 200 мкл (комплектации ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС) или 400 мкл (комплектация ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА) промывочного раствора №1 и встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с (таблица 2).
- 6.10** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты.
- 6.11** Не задеявая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.12** Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- 6.13** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты.
- 6.14** Не задеявая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.15** Добавьте к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- 6.16** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты.
- 6.17** Не задеявая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.18** Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 50 °С в течение 5 мин.
- 6.19** Добавьте к осадку 100 мкл (комплектация ПРОБА-ГС) или 300 мкл (комплектации ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА) элюирующего раствора и встряхните пробирки на вортексе в течение 5-10 с.
- 6.20** Прогрейте пробирки при 50 °С в течение 5 мин (таблица 2).
- 6.21** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение одной минуты. Если образец предполагается хранить более 7 суток, перенесите надосадочную жидкость в новую пробирку. Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации. Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре от 2 °С до 8 °С. Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо повторить 6.20 - 6.21. Более 7 суток препарат ДНК следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С. Срок хранения - до 6 месяцев (комплектации ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС) или до одного года (комплектация ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА) (таблица 2).

7 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

7.1 Транспортирование

Транспортирование комплекта реагентов осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 8 °С.

Комплекты реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

7.2 Хранение

Комплект реагентов для выделения ДНК следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности комплекта реагентов.

Примечание – При хранении допускается выпадение небольшого осадка в лизирующем растворе и в промывочном растворе №1.

Комплекты реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

7.3 Указания по эксплуатации

Комплект реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению. Для получения достоверных результатов необходимо строго соблюдение инструкции по применению комплекта реагентов.

После вскрытия упаковки компоненты комплекта реагентов следует хранить при следующих условиях:

- компоненты комплекта реагентов следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности комплекта реагентов.
- лизирующий раствор и промывочный раствор №1 следует хранить в защищённом от света месте в течение всего срока годности комплекта реагентов при температуре от 2 °С до 8 °С.

8 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

8.1 При использовании комплекта 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.

8.2 Комплекты 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.

9 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

9.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплекта реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

9.2 Срок годности комплекта реагентов - 6 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

10 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

По вопросам, касающимся качества комплекта 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.

Адрес производителя:

ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

Код изготовителя указан на этикетке (см. последнюю цифру в серии набора):

1) ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

2) ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

11 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ

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

Т а б л и ц а 2

Комплектация	ПРОБА-ГС	ПРОБА-ГС-ПЛЮС	ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА
Необходимый объем исследуемого образца и отрицательного контрольного образца для проведения выделения ДНК	50 мкл		100 мкл
Время термостатирования образцов в лизирующем растворе	20 мин		10 мин
Количество промывочного раствора №1 для выделения одного образца	200 мкл		400 мкл
Количество элюирующего раствора для выделения одного образца	100 мкл	300 мкл	
Срок хранения полученной ДНК при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С	до 6 месяцев		до одного года



1143 2025-02-13



For professional use only

PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit
PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit
INSTRUCTION FOR USE



OBELIS S.A
Registered Address:
Bd. Général Wahis, 53
1030 Brussels, Belgium
Tel: +32.2.732.59.54
Fax: +32.2.732.60.03
E-mail: mail@obelis.net
<http://www.obelis.net>



"DNA-Technology Research & Production", LLC,
142281, Russia,
Moscow Region, Protvino,
Zheleznodorozhnaya Street, 20
Phone/fax: +7(495) 640.17.71
E-mail: info@dna-technology.com
<https://www.dna-technology.com>
Customer service department



P-034-N/1EU
P-036-N/1EU
P-036-N/2EU



1143.2025.02.13

TABLE OF CONTENTS

1. INTENDED USE	3
2. METHOD	3
3. CONTENT	3
4. REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
5. TRANSPORT AND STORAGE CONDITIONS	6
6. WARNINGS AND PRECAUTIONS	6
7. SAMPLES	7
8. PROCEDURE	26
9. SPECIFICATIONS	28
10. QUALITY CONTROL	29
11. KEY TO SYMBOLS	30

1. INTENDED USE

The **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** and **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit** are intended for nucleic acid extraction from human biological material, microbial cultures extracted from this biomaterial, hard ticks (Ixodidae), as well as from biological material of fallen and diseased animals (if necessary) for further PCR/RT-PCR analysis. Human biological material includes: blood (plasma, leukocytes), saliva, phlegm, milk, urine, ejaculate, prostate secretion, liquor, respiratory smears/scrapes, oropharyngeal and nasopharyngeal flushes, smears/scrapes (discharge) from urogenital tract, smears/scrapes from gastrointestinal tract, feces (or meconium), biopsy samples (including formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples of tumor tissues), autopsy material, punctate, tissue samples, surgical material (tuberculoma contents), synovial fluid, amniotic fluid, gastric juice, exudates, bronchoalveolar lavage, pleural fluid, endotracheal and nasopharyngeal aspirates, epithelial cell scrapes (discharge) from the conjunctiva of the eye, smears/scrapes from affected skin and erosive-ulcerous elements, nails, vesicular fluid, catheter flushes, endotracheal tube smears and flushes. Biological material from fallen and diseased animals can be used (if necessary): smears and flushes from trachea, nasal cavity, pharynx, cloaca; feces; internal organs.

This medical device is an auxiliary agent in clinical laboratory diagnostics.

The application of the kits does not depend on population and demographic aspects. There are no contradictions for use of the **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** and **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit**.

The **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** and **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kits** can be used in clinical and diagnostic laboratories of medical institutions and research practice.

Potential users: personnel qualified in biomaterial collection and pretreatment, molecular diagnostics methods and working in the clinical and diagnostic laboratory in the established order: doctor of clinical diagnostic laboratory, medical technologist.

It is necessary to apply the kits only as directed in this instruction for use.

2. METHOD

The method is based on lysis and nucleic acid release under the action of a chaotropic agent (guanidine thiocyanate), followed by alcohol precipitation and washing from impurities.

3. CONTENT

The detailed description of content is represented in Tables 1-3.

Table 1. The **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** content for P-034-N/1EU

Reagent	Description	Total volume	Amount
Lysis solution	Light blue foamy liquid	30 mL	1 vial
Precipitation buffer	Colorless transparent liquid	40 mL	1 vial
Wash solution No. 1	Colorless transparent liquid	45 mL	1 vial
Wash solution No. 2	Colorless transparent liquid	30 mL	1 vial
Dilution buffer	Colorless transparent liquid	5.1 mL (1.7 mL in each)	3 tubes
Negative control	Colorless transparent liquid	3.0 mL (1.5 mL in each)	2 tubes

Table 2. The **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit** content for P-036-N/1EU, Set No. 1

Reagent	Description	Total volume	Amount
Lysis solution	Light blue foamy liquid	30 mL	1 vial
Precipitation buffer	Colorless transparent liquid	40 mL	1 vial
Wash solution No. 1	Colorless transparent liquid	45 mL	1 vial
Wash solution No. 2	Colorless transparent liquid	30 mL	1 vial
Dilution buffer	Colorless transparent liquid	30 mL	1 vial
Negative control	Colorless transparent liquid	3.0 mL (1.5 mL in each)	2 tubes

Table 3. The **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit** content for P-036-N/2EU, Set No. 2

Reagent	Description	Total volume	Amount
Lysis solution	Light blue slightly foaming liquid	15 mL	1 vial
Precipitation buffer	Colorless transparent liquid	20 mL	1 vial
Wash solution No. 1	Colorless transparent liquid	22.5 mL	1 vial
Wash solution No. 2	Colorless transparent liquid	15 mL	1 vial
Dilution buffer	Colorless transparent liquid	15 mL	1 vial
Negative control	Colorless transparent liquid	1.5 mL	1 tube

In the **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit** the total volume of purified DNA/RNA is larger (300 µL) comparing to standard **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** (50 µL) for more PCR tests.

The **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** is designed for NA extraction from 100 test samples (up to 50 runs), including negative controls.

PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit, set No. 1 is designed for nucleic acid extraction from 100 test samples (up to 50 runs), including negative controls.

PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit, set No. 2 is designed for nucleic acid extraction from 50 test samples (up to 25 runs), including negative controls.

4. REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

4.1. Specimen collection

- Sterile single use swabs and sterile containers to collect clinical material.

4.2. NA extraction

- Biological safety cabinet class II;
- Vortex mixer;
- Refrigerator with freezer;
- High speed centrifuge for 1.5 mL tubes (RCF(g) 12,000);
- Solid-state thermostat (temperature at least 65 °C);
- RNase and DNase free 1.5 mL tubes with locking caps (e.g. Eppendorf Safe-Lock tubes);

- Tube rack for 1.5 mL tubes;
- Physiological saline solution 0.9% NaCl (Sterile);
- Electric laboratory aspirator with trap flask for the removal of supernatant;
- Single channel pipettes (dispensers covering 20-1,000 µL volume range);
- RNase and DNase free filtered pipette tips for semi-automatic dispensers (volume 20 µL; 200 µL; 1,000 µL);
- RNase and DNase free non-filtered pipette tips for aspirator with trap flask;
- Container for used pipette tips, tubes and other consumables;
- Powder-free surgical gloves;
- Disinfectant solution;
- Transport medium for transport and storage of media;
- Physiological saline solution (0.9% NaCl, sterile).

Additional equipment for NA extraction from blood plasma:

- vacuum plastic tubes (Vacuette) with EDTA or sodium citrate;
- centrifuge for Vacuette tubes with RCF(g) at least 900.

Additional equipment for NA extraction from leukocyte blood fraction:

- vacuum 2.0 mL/4.0 mL plastic tubes (Vacuette) with anticoagulant;
- centrifuge for 2.0 mL tubes with RCF(g) at least 50;

Additional equipment for NA extraction from hard ticks (Ixodidae):

- homogenizing rods for 1.5 mL plastic tubes;
- 96% ethanol.

Additional equipment for NA extraction from phlegm (method 1):

- Centrifuge with RCF(g) at least 900;
- 10% trisodium phosphate x 12H₂O;
- 1.0M HCl solution;
- 5.0% chloramine solution;
- Distilled water.

Additional equipment for NA extraction from phlegm (method 2):

- Mucolysin.

Additional equipment for NA extraction from FFPE tumor tissues (if necessary):

- **PREP-PK** kit for biomaterial pretreatment during nucleic acid extraction

Additional equipment for NA extraction from feces and bacterial cultures obtained from feces (if necessary):

- **PREP-L** kit for biomaterial lysozyme pretreatment during DNA extraction

5. TRANSPORT AND STORAGE CONDITIONS

Expiry date – 12 months from the date of production.

The **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** and **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit** must be transported in thermoboxes with ice packs by all types of roofed transport at temperatures inside the thermoboxes corresponding to storage conditions of the kit components.

Kits transported with violation of temperature conditions must not be used.

All components of the **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** and **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit** must be stored at temperatures from 2 °C to 25 °C and out of light over the storage period.

A little precipitate is allowed in lysis solution during storage.

The excessive temperature and light can be detrimental to product performance.

Shelf-life of the kit following the first opening of the primary container: the components of the kit must be stored in a refrigerator or a cooling chamber at temperatures from 2 °C to 8 °C and out of light over the storage period.

The kit stored under undue regime must not be used.

An expired **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** must not be used.

We strongly recommend to follow the given instructions in order to obtain accurate and reliable results.

The conformity of the **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** and **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit** to the prescribed technical requirements is subject to compliance of storage, transportation and handling conditions recommended by manufacturer.

Contact our official representative in EU by quality issues of the **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** and **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit**.

6. WARNINGS AND PRECAUTIONS

Only personnel trained in the methods of molecular diagnostics and the rules of work in the clinical and diagnostic laboratory are allowed to work with the kit.

Handle and dispose all biological samples, reagents and materials used to carry out the assay as if they were able to transmit infective agents. The samples must be exclusively employed for certain type of analysis. Samples must be handled under a laminar flow hood. Tubes containing different samples must never be opened at the same time. Pipettes used to handle samples must be exclusively employed for this specific purpose. The pipettes must be of the positive dispensation type or be used with aerosol filter tips. The tips employed must be sterile, free from the DNases and RNases, free from DNA and RNA. The reagents must be handled under a laminar flow hood. The reagents required for amplification must be prepared in such a way that they can be used in a single session. Pipettes used to handle reagents must be exclusively employed for this specific purpose. The pipettes must be of the positive dispensation type or be used with aerosol filter tips. The tips employed must be sterile, free from the DNases and RNases, free from DNA and RNA. Avoid direct contact with the biological samples reagents and materials used to carry out the assay. Wear powder-free surgical gloves. Wear protective clothing (work clothes and personal protective equipment) working with microorganisms classified as particularly pathogenic. The protective clothing and personal protective equipment must comply with the work to be performed and health and safety requirements. Avoid producing spills or aerosol. Any material being exposed to biological samples must be treated for at least 30 minutes with disinfecting solution or autoclaved for 1 hour at 121 °C before disposal.

Molecular biology procedures, such as nucleic acids extraction, reverse transcription, PCR-amplification and detection require qualified staff to avoid the risk of erroneous results, especially due to the degradation of nucleic acids contained in the samples or sample contamination by amplification products.

All the liquid solutions are designed for single use and cannot be used more than once in amplification reactions. Plastic tubes do not contain phthalates. Do not breathe gas/fumes/vapor/spray produced by the components of the kit. Do not eat/drink components of the kit. Avoid contact with eyes. Only use the reagents provided in the kit and those recommended by manufacturer. Do not mix reagents from different batches. Do not use reagents from third party manufacturers' kits. All laboratory equipment, including pipettes, test tube racks, laboratory glassware, lab coats, bouffant caps, etc., as well as reagents should be strictly stationary. It is not allowed to move them from one room to another. Equip separate areas for the

extraction/preparation of amplification reactions and for the amplification/detection of amplification products. Never introduce an amplification product in the area designed for extraction/preparation of amplification reactions. Wear lab coats, gloves and tools, which are exclusively employed for the extraction/preparation of the amplification reaction and for the amplification/detection of the amplification products. Never transfer lab coats, gloves and tools from the area designed for amplification/detection of the amplification products to the area designed for extraction/preparation of amplification reactions. Remove waste materials (tubes, tips) only in a special closed container containing a disinfectant solution. Work surfaces, as well as rooms where NA extraction and PCR are performed, must be irradiated with bactericidal irradiators for 30 minutes before and after the work.

Waste materials are disposed of in accordance with local and national standards. All surfaces in the laboratory (work tables, test tube racks, equipment, etc.) must be treated daily with disinfecting solution.

Emergency actions

Eye Contact: If any component of this kit enters the eyes, wash eyes gently under potable running water for 15 minutes or longer, making sure that the eyelids are held open. If pain or irritation occurs, obtain medical attention.

Skin Contact: If any component of this kit contacts the skin and causes discomfort, remove any contaminated clothing. Wash affected area with plenty of soap and water. If pain or irritation occurs, obtain medical attention.

Ingestion: If any component of this kit is ingested, wash mouth out with water. If irritation or discomfort occurs, obtain medical attention.

Do not use the kit:

- When the transportation and storage conditions are breached;
- When the reagents' appearance does not respond to the kit passport;
- When the kit components packaging is breached;
- After the expiry date provided.

Significant health effects are **NOT** anticipated from routine use of this kit when adhering to the instructions listed in the current manual.

7. SAMPLES

The **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** and **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit** is designed to extract DNA/RNA from peripheral/umbilical blood (plasma and serum, leukocytes), saliva, phlegm, milk, urine, ejaculate, prostate secretion, liquor, respiratory smears/scrapes, oropharyngeal and nasopharyngeal flushes, smears/scrapes (discharge) from urogenital tract, smears/scrapes from gastrointestinal tract, feces (or meconium), biopsy samples (including formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples of tumor tissues), autopsy material, punctate, tissue samples, surgical material (tuberculoma contents), synovial fluid, amniotic fluid, gastric juice, exudates, bronchoalveolar lavage, pleural fluid, endotracheal and nasopharyngeal aspirates, epithelial cell scrapes (discharge) from the conjunctiva of the eye, smears/scrapes from affected skin and erosive-ulcerous elements, nails, vesicular fluid, catheter flushes, endotracheal tube smears and flushes. Biological material from fallen and diseased animals can be used (if necessary): smears and flushes from trachea, nasal cavity, pharynx, cloaca; feces; internal organs.

Interfering substances

PCR inhibitors include: hemoglobin and medications present in NA samples due to incomplete removal during NA extraction from the sample, isopropyl alcohol, methyl acetate present in NA samples due to incomplete removal of washout solutions during sample preparation.

Maximum concentrations on interfering substances than can be present in samples without affecting PCR: hemoglobin — 0.35 mg/mL, isopropyl alcohol — 100 µL /mL of NA sample, methyl acetate — 100 µL /mL of NA sample.

When extracting NA from blood plasma, maximum concentrations of interfering substances that did not affect reverse transcription and amplification of laboratory control were: triglycerides — up to 40 mmol/L of plasmas, hemoglobin — up to 2.0 g/L, bilirubin — up to 340 µmol/L, crude protein — 60 g/L.

To assess possible interference of medication, the ones that could potentially be residual in human samples from the desired biotopes were selected.

Maximum concentrations on interfering substances than can be present in samples without affecting RT-PCR: whole blood – 5.0% v/v, chlorhexidine (water solution 0.05%), “Lasolvan Rhino” (nasal spray), Rhinofluimucil (nasal spray), Tisin (nasal spray), Oxolin (nasal ointment), Pinosol (nasal drops), Tantum Verde (topical spray), Hexoral (topical aerosol), Berodual (dosed inhalation aerosol), Salbutamol-Teva (dosed inhalation aerosol), Grippferon (dosed nasal spray) – 10% v/v.

General requirements

During biomaterial preparation and MA extraction, use RNase and DNase free single-use tips (filtered, except for supernatant collection using aspirator).

When adding solution into a tube with biomaterial, introduce liquids carefully, without touching the walls of tubes. If touching occurred, change the tip. Tip shall be changed after each removal of solution from the sample.

To prevent contamination, only open the tube you are currently working with and close it before proceeding to the next tube.

Sample collection

WARNING! Before NA extraction sample pretreatment may be needed.

Sample collection is performed according to Table 4.

In case sample is collected into a transport medium intended for transport and storage of PCR samples, please collect the sample in accordance with instruction to the transport medium.

Transport and storage of samples

Transport and storage of samples is performed according to Table 5.

In case samples are collected into a transport medium intended for transport and storage of PCR samples, transport and storage conditions for the samples are determined by the instruction to the transport medium.

If the study is intended to detect RNA of SARS-CoV-2 and similar SARS-CoV coronaviruses, transport and storage of the material shall be carried out in accordance with Table 6.

WARNING! Please avoid repeated freezing and thawing of samples!

Table 4. Sample collection for NA extraction

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
Amniotic fluid	-	Amniotic fluid is taken during the amniocentesis procedure according to the approved algorithm.	At least 500 µL of amniotic fluid is placed in a dry sterile container with a tightly screw cap. After sample taking close the container tightly.

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
Autopsy material Biopsy samples Tissue samples Punctate	-	The material is collected in tubes with transport medium designed by the manufacturer for transport and storage of PCR samples.	Samples with a diameter of no more than 5 mm are placed in tubes with transport medium. After sample intake close the tubes tightly and mark them.
Bacterial cultures	-	Bacterial cultures from liquid and solid media are taken into disposable plastic tubes of 1.5-2.0 mL with 500 µL of sterile physiological saline solution.	Using a disposable microbiological loop or spatula, place a single colony of cells or 100 µL of liquid medium into each tube. After collection, close the tubes tightly and mark them.
Bronchoalveolar lavage Nasopharyngeal and endotracheal aspirates, pleural fluid	-	Bronchoalveolar lavage is taken during the bronchoscopy procedure according to the approved algorithm. The sample is taken into empty disposable tightly screwed tubes with a volume of up to 50 mL.	At least 500 µL of bronchoalveolar lavage is collected in a sterile container. After taking the material, the container is tightly closed. If the RNA of SARS-CoV-2 and similar SARS-CoV coronaviruses is supposed to be detected, each sample is placed in a separate transport container, ensuring the requirements in accordance with the table of guidelines for laboratory diagnosis of COVID-19 (Table 6).
Vesicular fluid Smears/scrapes from affected skin and erosive-ulcerous elements Scrapes of epithelial cells (discharge) from conjunctiva of the eye Exudates	Topical application of medications (sprays, drops, creams and ointments) less than 24 hours before the assay.	Material is collected using special medical devices with registration certificates, according to the procedure established depending on the source of biomaterial. Samples are taken: – into 1.5 mL plastic tubes with 300-500 µL of sterile physiological saline solution;	After taking the material, transfer the probe into a tube with physiological saline solution or transport medium intended by the manufacturer for transportation and storage of PCR samples and rinse it thoroughly in the liquid for 10-15 s, avoiding splashing. Remove the probe

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
		– into tubes with transport medium intended by the manufacturer for transportation and storage of PCR samples. Features of conjunctiva sampling If there is abundant purulent discharge, it is removed with a sterile cotton swab moistened with physiological saline solution. Discharge/scrape is taken from the inner surface of the lower eyelid by moving to the inner corner of the eye slit. When taking the scrape, hold the eyelid with the hands so that the eyelashes do not touch the probe when blinking.	from the solution and squeeze out the excess liquid by rotating it against the inner wall of the tube above the solution level. Completely remove the probe from the tube and discard. Close the tube tightly and mark it.
Nails	Topical application of medications (creams and ointments) less than 24 hours before the assay.	The material is collected in tubes with transport medium designed by the manufacturer for transport and storage of PCR samples.	Samples is ~2x10 mm in size are placed in tubes with transport medium. After collection, the tubes are tightly closed and marked.
Internal organs of animals	-	Internal organs of animals are taken into a dry sterile container.	Internal organs (trachea and lung fragments, spleen, brain, liver, etc.) are placed in a dry sterile container. After taking the material, the container is tightly closed and marked.
Gastric juice	-	Gastric juice is taken during the gastroscopy according to the approved algorithm.	At least 500 µL of gastric juice is collected in a sterile container. After collection, the container is tightly

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
			closed.
Hard ticks (Ixodidae)	-	The tick is collected in a clean container with a tightly closing cap.	Place a piece of damp cloth or water-soaked tissue in the container (to prevent the tick from drying out). Place a live tick in the container.
Liquor	-	Cerebrospinal fluid (liquor) is taken with disposable needles into 1.5 mL tubes according to the established procedure.	At least 500 μ L of liquor is collected in a disposable tube. After collection, the tubes are tightly closed and marked.
Endotracheal tube smears and flushes Smears/scrapes of epithelial cells from oropharynx, nasopharynx	Topical application of medications (sprays, drops, creams and ointments) less than 24 hours before the assay. When using aerosols and other forms of medications for inhalation in the treatment of bronchial asthma, samples should be taken no earlier than three hours after inhalation.	Material is collected using special medical devices with registration certificates, according to the procedure established depending on the source of biomaterial. Samples are taken: – into 1.5 mL plastic tubes with 300-500 μL of sterile physiological saline solution; – into tubes with transport medium intended by the manufacturer for transportation and storage of PCR samples. Features of nasal smears/scrapes collection The probe is inserted with a slight movement along the outer wall of the nose to a depth of 2-3 cm to the lower nasal shell. Then the probe is slightly lowered downwards, inserted into the lower nasal passage under the lower	After taking the material, transfer the probe into a tube with physiological saline solution or transport medium intended by the manufacturer for transportation and storage of biological material samples for PCR assay and rinse it thoroughly in the liquid for 10-15 s, avoiding splashing. Remove the probe from the solution and squeeze out the excess liquid by rotating it against the inner wall of the tube above the solution level. Completely remove the probe from the tube and discard. Close the tube tightly and mark it. In the case of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-like coronaviruses, each biomaterial sample should be placed in a separate transport container, ensuring the requirements listed to Table 6.

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
		nasal shell, rotated and removed along the outer nasal wall. Features of oropharyngeal smears/scrapes collection Smears/scrapes are taken with a rotating motion from the surface of the tonsils, palatine glands and posterior pharyngeal wall.	
Milk	-	Breast milk is collected in a sterile container with a hermetically closing cap. The period of milk collection is up to 24 hours. Storage during the entire collection period at a temperature of 2 ° C to 8 ° C.	After collection is complete, the milk is mixed and 1.0 mL of material is transferred to a 1.5 mL plastic tube.
Phlegm	-	Material is taken into single-use graduated sterile vials with a wide neck and screw caps with a volume of at least 50 mL.	At least 1.0 mL of phlegm is collected in a vial. In case RNA of SARS-CoV-2 and similar SARS-CoV coronaviruses are supposed to be detected, each biomaterial sample is placed in a separate transport container, ensuring the requirements listed in Table 6.
Urine	-	Urine is taken into a dry sterile container up to 60 mL in volume with a hermetically screwed cap. Features of residual urine collection after prostate massage WARNING! If acute prostatitis is suspected, prostate massage is strictly forbidden! Before taking residual	For the assay, the first portion of morning urine is collected in an amount of at least 20 - 30 mL. After urine collection, the container is tightly closed and marked. Residual urine after prostate massage 10-15 mL of residual urine is collected by the patient after the

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
		urine after prostate massage, sexual abstinence is recommended for three days before the examination. The patient urinates in the toilet, leaving some of the urine in the bladder. Before collecting urine, the head of the penis is treated with a sterile cotton swab moistened with physiological saline solution. The patient is given a massage of the prostate gland for 1-3 minutes. The intensity of the massage depends on the consistency of the prostate: if the prostate is soft, gentle pressure is applied, if the prostate is dense, the pressure is increased.	end of the massage. The first portion of urine is collected in a dry sterile container up to 60 mL in volume with a tightly screwed cap. After collection, the container is tightly closed and marked.
Peripheral/umbilical blood	Intravenous injections of heparin, infusion of for parenteral nutrition less than 6 hours before the assay.	Blood is drawn into 2.0 mL/4.0 mL/9.0 mL Vacuette vacuum plastic tubes with EDTA salt added as an anticoagulant at a final concentration of 2.0 mg/mL. Sodium citrate may also be used as an anticoagulant (if it does not contradict the requirements for the PCR reagent kit used together with the reagent kit in all versions). WARNING! Heparin as an anticoagulant is not allowed!	To mix the blood with the anticoagulant after sample intake, gently invert the tube at least 3-5 times.
Prostate secretion	-	Before taking the prostate secretion, sexual abstinence is recommended for three days before the assay.	Collection of prostatic secretion is carried out after the end of massage in a 2.0 mL tube or a container up

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
		Before collecting the material, the head of the penis is treated with a sterile cotton swab moistened with physiological saline solution. Prostate secretion is collected after preliminary prostate massage through the rectum. The massage is performed by the doctor by means of a vigorous pressure movement from the base to the top of the gland. WARNING! If acute prostatitis is suspected, prostate massage is strictly forbidden!	to 60 mL in volume in the form of a free-flowing drop (0.15-1.0 mL). After collection, the container with prostate secretion is tightly closed and marked.
Synovial fluid Saliva	-	Sample is taken in a sterile container.	At least 500 µL of material is collected in a sterile container. After collection, the container is tightly closed and marked.
Oropharyngeal and nasal flushes	-	Features of oropharyngeal flushes collection Before taking oropharyngeal flushes, preliminary rinsing of the oral cavity with water is carried out. After that, a thorough rinsing of the oropharynx (for 10-15 s) with 8.0-10 mL of sterile physiological saline solution is carried out. The liquid is collected through a funnel into a sterile tube. It is not allowed to reuse the funnel without prior autoclaving. Features of nasal flushes collection The material is taken in a sitting position with the	Transfer 300 µL of the collected fluid into a 1.5 mL plastic tube. If material is taken from several biotopes, it should be transferred to separate tubes. Close the tube tightly and mark it. In case RNA of SARS-CoV-2 and similar SARS-CoV coronaviruses are supposed to be detected, each biomaterial sample is placed in a separate transport container, ensuring the requirements listed in Table 6.

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
		patient's head tilted backwards. To obtain a flush from the nasal cavity, 3.0-5.0 mL of warm sterile physiological saline solution is injected alternately into both nasal passages using a probe or disposable syringe. The flushing fluid from both nasal passages is collected through a funnel into one sterile tube. It is not allowed to reuse the funnel without prior autoclaving. If it is necessary to take biomaterial from several biotopes, repeat the procedure, each time taking the material into a new tube.	
Venous catheter flushes	-	Venous catheter flushes are obtained in the laboratory during material treatment.	Cut off 5-10 mm of the catheter tip with sterile scissors and place it in a disposable, empty 1.5 mL plastic tube. Close the tube tightly and mark it.
Endotracheal tubes flushes	-	Sample is taken into a dry sterile 50 mL container with a hermetically screwed cap.	After collecting the material, the tubes are tightly closed and marked. To mix the material, invert the tube 3-5 times. In case RNA of SARS-CoV-2 and similar SARS-CoV coronaviruses are supposed to be detected, each biomaterial sample is placed in a separate transport container, ensuring the requirements listed in Table 6.
Tuberculoma contents	-	Surgical material is	The contents of the

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
		taken into a dry sterile container.	tuberculoma are placed in a dry sterile container. After sampling, the container is tightly closed and marked.
Smears/scrapes from gastrointestinal tract	Use of rectal suppositories, laxatives, medications containing a high percentage of iron, colposcopy — less than 48 hours before the assay	Material is collected using special medical devices with registration certificates, according to the procedure established depending on the source of biomaterial. Samples are taken: – into 1.5 mL plastic tubes with 300-500 µL of sterile physiological saline solution; – into tubes with transport medium intended by the manufacturer for transportation and storage of PCR samples.	After taking the material, transfer the probe into a tube with physiological saline solution or transport medium intended by the manufacturer for transportation and storage of biological material samples for PCR assay and rinse it thoroughly in the liquid for 10-15 s, avoiding splashing. Remove the probe from the solution and squeeze out the excess liquid by rotating it against the inner wall of the tube above the solution level. Completely remove the probe from the tube and discard. Close the tube tightly and mark it.
Smears/scrapes from urogenital tract	Topical application of medications, use of lubricants, vaginal ultrasound — less than 24 hours before the assay.	Material is collected using special medical devices with registration certificates, according to the procedure established depending on the source of biomaterial. Samples are taken: – into 1.5 mL plastic tubes with 300-500 µL of sterile physiological saline solution; – into tubes with transport medium intended by the	After taking the material, transfer the probe into a tube with physiological saline solution or transport medium intended by the manufacturer for transportation and storage of biological material samples for PCR assay and rinse it thoroughly in the liquid for 10-15 s, avoiding splashing. Remove the probe from the solution and squeeze out the excess liquid by rotating it against the inner wall

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
		manufacturer for transportation and storage of PCR samples. Features of urogenital scrape collection Women should not perform genital toilet or sprays the day before the examination. In order to obtain an objective result, it is necessary that the sample contains as many epithelial cells as possible and a minimum amount of mucus and blood. Incorrect sampling may lead to an unreliable result and, therefore, to the need for a second sampling. WARNING! Before obtaining a scrape of epithelial cells from the urethra, posterolateral vaginal vault and cervical canal, remove the free-flowing discharge with a sterile cotton swab. Features of vaginal sampling The material should be taken before the manual examination. The mirror before manipulation can be moistened with hot water, the use of antiseptics to treat the mirror is contraindicated. The scraping is taken from the posterolateral vaginal vault. In girls, the material is taken from the mucous membrane of the vaginal vestibule, and in some cases from the posterior vaginal	of the tube above the solution level. Completely remove the probe from the tube and discard. Close the tube tightly and mark it.

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
		vault through the hymenal rings. Features of urethral sampling Before taking the biomaterial, the patient is recommended to refrain from urination for 1.5-2 hours. Immediately before taking the biomaterial it is necessary to treat the external urethral orifice with a tampon, which can be moistened with sterile saline solution. In the presence of purulent discharge it is recommended to take a scrape 15-20 minutes after urination, in the absence of discharge it is necessary to massage the urethra with a probe for biomaterial collection. In women, the probe is inserted into the urethra at a depth of 1.0-1.5 cm; in children, the material for the assay is taken only from the external urethral orifice. Features of cervical canal sampling Before sampling remove mucus with a cotton swab and then treat the cervix with sterile physiologic solution. The probe is inserted into the cervical canal to a depth of 0.5-1.5 cm. When removing the probe, avoid touching the vaginal wall. Features of sampling from the foreskin of the glans of the penis, preputial sac Before taking the	

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
		biomaterial, the patient is recommended to refrain from urination for 1.5-2 hours.	
Animal feces	-	Animal feces are taking into a dry sterile container.	Animal feces in the amount of 4-5 g are placed in a dry sterile container. After material collection, the container is tightly closed and labeled.
Feces (meconium)	-	Fecal or meconium samples with a mass (volume) of approximately 1-3 g (1-3 ml) are used for the assay. The material is collected with a separate filter tip or disposable spatula into a dry sterile vial.	At least 1.0 g of feces (meconium) is placed in a dry sterile vial. After taking the material, the vial is tightly closed and labeled.
Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues	-	Material collection is performed only by a pathomorphologist. To prepare slices use a clean, sharp microtome blade, cut 2 sections of 10 microns thickness or 3-5 sections of 5 microns thickness from a pre-cut block of paraffin-embedded tissue (approximate cut area 0.5-1.5 cm ²). Paraffin sections are placed in disposable 1.5 mL plastic tubes. The recommended amount of tissue should not be exceeded, as excess paraffin-embedded tissue may reduce the yield of total RNA.	2-4 paraffin slices of 5.0 micron thickness (approximate slice area 0.5-1.5 cm ²) are placed in the tube. After taking the material, the tube is tightly closed and labeled.
Ejaculate	-	Before taking the ejaculate (seminal fluid), sexual abstinence is recommended for three days before the test. Before collecting the ejaculate, the patient urinates in the toilet,	After taking the material, the tube is tightly closed and labeled.

Biomaterial	Method limitations	Features of collection	Order of collection
		emptying the bladder completely. After urination, the patient should wash hands thoroughly with soap and water and toilet the external genitalia with soap and water. The penile head and foreskin should be dried with a sterile tissue. Ejaculate is obtained by masturbation. The ejaculate is collected in a sterile container with a volume of up to 60 mL and a tightly screw cap.	

Table 5. Storage and transport conditions for biological material samples prior to NA extraction

Biomaterial	Transport and storage temperature	Time before NA extraction
Amniotic fluid	from 2 °C to 8 °C	up to 24 hours
Autopsy material	from minus 18 °C to minus 20 °C	up to 7 days
Bacterial cultures	minus 70 °C	prolonged period
Biopsy samples	WARNING! If the assay is intended to detect RNA of SARS-CoV-2 and similar SARS-CoV coronaviruses, transportation and storage of the material shall be carried out in accordance with Table 6. Note. For bacterial cultures repeated freezing-thawing is allowed.	
Tissue samples		
Punctate		
Oropharyngeal and nasopharyngeal flushes, venous catheter flushes, endotracheal tubes flushes		
Bronchoalveolar lavage	from 2 °C to 8 °C	up to 24 hours
Nasopharyngeal, endotracheal aspirates	from minus 18 °C to minus 20 °C	up to 7 days
Urine	WARNING! If the assay is intended to detect RNA of SARS-CoV-2 and similar SARS-CoV coronaviruses, transportation and storage of the material shall be carried out in accordance with Table 6.	
Pleural fluid		
Vesicular fluid	from 2 °C to 8 °C	up to 24 hours
Smears from endotracheal tubes	from minus 18 °C to minus 22 °C	up to 1 month
Milk	WARNING! If the assay is intended to detect RNA of SARS-CoV-2 and similar SARS-CoV coronaviruses, transportation and storage of the material shall be carried out in accordance with Table 6.	
Prostate secretion		
Synovial fluid		
Saliva		
Smears/scrapes of epithelial sales from oropharynx, nasopharynx, gastrointestinal tract, urogenital tract, affected skin and erosive-ulcerous elements, epithelial cells (discharge) from conjunctiva of the eye		
Ejaculate		

Biomaterial	Transport and storage temperature	Time before NA extraction
Nails		
Internal organs of animals Gastric juice Tuberculoma contents Animal feces	from 2 °C to 8 °C	up to 24 hours
Hard ticks (Ixodidae)	from 2 °C to 8 °C	up to 48 hours
	WARNING! Transport and storage conditions are intended for a live tick in moistened medium.	
Liquor	from 20 °C to 25 °C	up to 2 hours
	from 2 °C to 8 °C	up to 6 hours
Phlegm Feces (meconium)	from 18 °C to 25 °C	up to 6 hours
	from 2 °C to 8 °C	up to 3 days
	WARNING! If the assay is intended to detect RNA of SARS-CoV-2 and similar SARS-CoV coronaviruses, transportation and storage of the material shall be carried out in accordance with Table 6.	
Peripheral/umbilical blood	от 20 °C до 25 °C	up to 2 hours
	from 2 °C to 8 °C	up to 6 hours
	WARNING! Don not freeze whole blood!	
Formalin-fixed paraffin-embedded tissues	from 18 °C to 25 °C	prolonged period
	WARNING! Paraffin melting is not allowed.	

Table 6. Transport and storage conditions for respiratory infections' samples

Sample	Sample collection requirements	Transport	Storage before assay	Notes
Nasopharyngeal and oropharyngeal swab	Plastic tubes and swabs for smears**	4 °C	≤5 days: 4 °C >5 days*: minus 70 °C	Nasopharyngeal and oropharyngeal smears should be placed into one tube to increase viral load
Bronchoalveolar lavage	Sterile container	4 °C	≤48 hours: 4 °C >48 hours*: minus 70 °C	A small dilution of the sample is possible
Endotracheal aspirate, nasopharyngeal aspirate or nasal flush	Sterile container	4 °C	≤48 hours: 4 °C >48 hours*: minus 70 °C	-
Phlegm	Sterile container	4 °C	≤48 hours: 4 °C >48 hours*: minus 70 °C	Make sure the material is coming from the lower respiratory tract

* - if it is impossible to store samples at minus 70 °C, store them at minus 20 °C.

** - for transporting samples use transport medium for respiratory smears or physiological solution (if transported to the laboratory no more than 24 hours after specimen collection) or dry probe tampon (if transported to the laboratory no more than 4 hours after sample collection).

Note. STOR-F transport medium is recommended (manufactured by “DNA-Technology TS”).

WARNING! Avoid repeated freezing and thawing of samples.

Preparation of samples for NA extraction

Sample preparation is performed in accordance with Table 7.

If the biomaterial samples were taken into the transport medium for transportation and storage of PCR samples, the preparation of the material is carried out in accordance with the instructions for use of the transport medium used for transport and storage of samples.

When working with reagent kits for detection of nucleic acids of pathogens of human acute respiratory viral infections, including SARS-CoV-2, by RT-PCR (manufactured by “DNA-Technology TS”, LLC), sample preparation is not required.

Table 7. Preparation of samples for nucleic acid extraction

Biomaterial	Sample preparation
Amniotic fluid Bronchoalveolar lavage Synovial fluid Saliva Liquor Pleural fluid	1. Transfer 500 µL of sample into 1.5 mL plastic tube. 2. Centrifuge the tube at RCF(g) 12,000-16,000 for 10 minutes. 3. Remove supernatant, leaving approximately 50 µL in the tube (precipitate + liquid fraction). 4. Add 500 µL of sterile physiological saline solution to precipitate. 5. Centrifuge the tube at RCF(g) 12,000-16,000 for 10 minutes. 6. Remove supernatant, leaving approximately 100 µL in the tube (precipitate + liquid fraction). Sample is ready for NA extraction. WARNING! When working with reagent kits for detection of nucleic acids of pathogens of human acute respiratory viral infections, including SARS-CoV-2, by RT-PCR (manufactured by “DNA-Technology TS”, LLC), sample preparation is not required. 100 µL of biomaterial is used for RNA extraction.
Autopsy material Biopsy samples Tissue samples Punctate	1. Shake the tube with biomaterial on vortex for 3-5 seconds, then spin for 3-5 seconds. 2. Remove supernatant. Sample is ready for NA extraction.
Bacterial cultures Vesicular fluid Smears from endotracheal tubes Smears/scrapes of epithelial cells from oropharynx, nasopharynx, gastrointestinal tract, urogenital tract, affected skin and erosive-ulcerous elements, epithelial	1. Centrifuge the tube with sample in physiological solution/transport medium at RCF(g) 12,000-16,000 for 10 minutes. 2. Remove supernatant, leaving approximately 100 µL in the tube (precipitate + liquid fraction). Sample is ready for NA extraction. WARNING! When working with reagent kits for detection of nucleic acids of pathogens of human acute respiratory viral infections, including SARS-CoV-2, by RT-PCR (manufactured by “DNA-Technology TS”, LLC), sample preparation is not required. 100 µL of biomaterial is used for RNA extraction.

Biomaterial	Sample preparation
cells (discharge) from conjunctiva of the eye Exudates	
Animal internal organs	1. Place ~250 mg of test sample into a 1.5 mL plastic tube. 2. Add 1.0 mL of sterile physiological saline solution into the tube. 3. Shake the tube with biomaterial on vortex for 3-5 seconds, then spin for 3-5 seconds. 4. Remove supernatant. Sample is ready for NA extraction.
Gastric juice	1. Transfer 500 µL of gastric juice into a 1.5 mL plastic tube. 2. Centrifuge the tube at RCF(g) 12,000-16,000 for 10 minutes. 3. Remove supernatant, leaving approximately 100 µL in the tube (precipitate + liquid fraction). Sample is ready for NA extraction.
Hard ticks (Ixodidae)	1. Place the tick into a 1.5 mL plastic tube. 2. Add 1.0 mL of 96% ethanol into the tube with the tick, shake the tube on vortex for 3-5 seconds, then spin for 3-5 seconds. 3. Remove supernatant as fully as possible. 4. Add 1.0 mL of sterile physiological saline solution, shake the tube on vortex for 3-5 seconds, then spin for 3-5 seconds. 5. Remove supernatant as fully as possible. Sample is ready for NA extraction. WARNING! Use pretreated sample for NA extraction immediately.
Phlegm	Method 1 1. Transfer 500 µL of phlegm sample into a sterile container. 2. Add to the sample an equal volume of 10% trisodium phosphate x12H₂O, close tightly and shake intensely 3. Incubate the mix at 37 °C for 18–24 hours, then neutralize 1 M HCl to pH 6.8-7.4. 4. Spin at RCF(g) 900 for 20 minutes. 5. Drain the supernatant into a container with 5 % chloramine solution for decontamination. 6. Add 500 µL of distilled water, mix by pipetting and transfer to 1.5 mL plastic tube. 7. Centrifuge the tube at RCF(g) 12,000-16,000 for 10 minutes. 8. Remove supernatant, leaving approximately 100 µL in the tube (precipitate + liquid fraction). Sample is ready for NA extraction.
Phlegm	Method 2 1. Add mucolysin to the vial with phlegm in proportion 5:1 (5 parts of mucolysin to 1 part of phlegm) based on the vial graduation. 2. Close the vial, shake the mixture and incubate at room temperature (from 18 °C до 25 °C) for 20-30 minutes, shaking the vial every 2-3 minutes. Sample is ready for NA extraction.
Milk	No preparation is required. Sample is ready for NA extraction.
Urine	1. Transfer 1.0 mL of urine into a 1.5 mL plastic tube. 2. Centrifuge the tube at RCF(g) 12,000-16,000 for 10 minutes. 3. Remove supernatant as fully as possible. 4. Add 1.0 mL of sterile physiological saline solution to the supernatant. 5. Centrifuge the tube at RCF(g) 12,000-16,000 for 10 minutes.

Biomaterial	Sample preparation
	6. Remove supernatant, leaving approximately 100 µL in the tube (precipitate + liquid fraction). Sample is ready for NA extraction.
Nasopharyngeal and endotracheal aspirates Flushes from endotracheal tubes	1. Transfer 1.0 mL of biomaterial into a 1.5 mL plastic tube 2. Centrifuge the tube at RCF(g) 12,000-16,000 for 10 minutes. 3. Remove supernatant, leaving approximately 100 µL in the tube (precipitate + liquid fraction). Sample is ready for NA extraction.
	WARNING! When working with reagent kits for detection of nucleic acids of pathogens of human acute respiratory viral infections, including SARS-CoV-2, by RT-PCR (manufactured by “DNA-Technology TS”, LLC), sample preparation is not required. 100 µL of biomaterial is used for RNA extraction.
Peripheral/umbilical blood	Obtaining plasma 1. Spin tubes with blood at RCF(g) 900 at room temperature (from 18 °C to 25 °C) for 20 minutes. 2. After spinning collect upper fraction (plasma) with a pipette and transfer it to a separate 1.5-2.0 mL plastic tube. Sample is ready for NA extraction.
	WARNING! 1. Time between peripheral blood collection and obtaining plasma shall not exceed 6 hours. It is allowed to store plasma at minus 20 °C for up to 3 months (if necessary). 2. Before NA extraction mix the plasma!
	Obtaining leukocyte fraction 1. Transfer 1.5 mL of whole blood into a 2.0 mL plastic tube. 2. Spin the tube with blood at RCF(g) 50 for 10 minutes. 3. After spinning collect 500-600 µL of upper fraction (plasma with leukocytes) with a pipette and transfer to a 1.5-2.0 mL plastic tube. 4. Centrifuge a tube with blood at RCF(g) 10,000 for 10 minutes. 5. Remove supernatant, leaving approximately 100 µL in the tube (precipitate + liquid fraction). Sample is ready for NA extraction.
Prostate secretion	1. Prepare the necessary amount of 1.5 mL plastic tubes with 500 µL of sterile physiological saline solution or transport medium for PCR samples. 2. Transfer 100 µL of liquid material into each tube. 3. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 for 10 minutes. 4. Remove supernatant, leaving approximately 100 µL in the tube (precipitate + liquid fraction). Sample is ready for NA extraction.
Oropharyngeal and nasal flushes	1. Centrifuge the tube with flush sample at RCF(g) 12,000-16,000 for 10 minutes. 2. Remove supernatant, leaving approximately 100 µL in the tube (precipitate + liquid fraction). Sample is ready for NA extraction.
	WARNING! When working with reagent kits for detection of nucleic acids of pathogens of human acute respiratory viral infections, including SARS-CoV-2, by RT-PCR (manufactured by “DNA-Technology TS”, LLC), sample preparation is not required. 100 µL of biomaterial is used for RNA extraction.
Flushes from	1. Add 100 µL of distilled water or 100 µL of sterile physiological saline

Biomaterial	Sample preparation	
fragments of venous catheter	solution into the tube with fragment of venous catheter. 2. Shake the tube with biomaterial on vortex for 3-5 seconds, then spin for 1-3 seconds. Sample is ready for NA extraction.	
Tuberculoma contents	Preparation is not required. Sample is ready for NA extraction.	
Human feces (meconium), animal feces	Preparation of suspension 1. Prepare the necessary amount of 1.5 mL plastic tubes with 1.0 mL of sterile physiological saline solution 2. Put 0.1-0.2 g (mL) of feces into each tube. 3. Resuspend the tube contents thoroughly on vortex for 5-10 seconds. 4. Centrifuge the tubes with feces suspension at RCF(g) 13,000 at room temperature (from 18 °C to 25 °C) for 30 seconds to precipitate debris to the bottom of the tube. 5. Mark one 1.5 mL tube for each suspension sample.	
	For bacterial NA extraction: 6. Add the middle fraction from the tubes with feces suspension to the corresponding marked tubes. For this purpose, draw 100 µL of the bacterial fraction (upper white-yellow part of the precipitate formed) from each tube with a separate filter tip. If there is no white-yellow boundary layer between the precipitate and the supernatant, draw 100 µL from the boundary between the precipitate and the supernatant, a partial capture of the precipitate is allowed. Note. An additional sample preparation using PREP-L reagent kit manufactured by DNA-Technology is allowed.	For viral NA extraction: 6. Add 100 µL of supernatant from the feces suspension tubes to the corresponding marked tubes.
	Sample is ready for NA extraction.	
	WARNING! If it is impossible to examine the material within a day and/or if long-term storage is necessary, glycerol at a final concentration of 10-15% is added to the feces suspension in sterile isotonic sodium chloride solution. Samples prepared in this way are frozen only after thorough homogenization and exposure to glycerol for 30-40 minutes.	
Formalin-fixed paraffin-embedded tissue	Paraffin-embedded tissue is pretreated using PREP-PK sample pretreatment reagent kit manufactured by DNA-Technology.	
Ejaculate	1. Prepare the necessary amount of 1.5 mL plastic tubes with 400-500 µL of sterile physiological saline solution or transport medium for PCR samples. 2. Transfer 100 µL of liquid material into each tube. 3. Shake the tube with biomaterial on vortex for 3-5 seconds, then spin	

Biomaterial	Sample preparation
	for 1-3 seconds. Sample is ready for NA extraction.
Nails taken into STOR-F transport medium	When working with reagent kits for detection of nucleic acids by PCR (manufactured by “DNA-Technology TS”, LLC), thermostate the tubes with biomaterial at 95 °C for 10 minutes, shake the tubes on vortex for 3-5 seconds, then spin for 1-3 seconds. 100 µL of biomaterial is used for DNA extraction.

8. PROCEDURE

WARNING!

1. Use RNase- and DNase-free filter tips to introduce and add reagents and samples.
2. When using the aspirator, use RNase- and DNase-free tips without a filter.
3. Change the tips each time the solution is removed from the tube.
4. To prevent contamination, only open and close the cap of the tube you are working with (sample/reagent addition, supernatant removal). Do not handle several tubes with open caps at the same time.
5. When adding solution to a tube containing biological material, introduce the solution carefully without touching the tube walls. If you touch the wall of the tube, change the tip.
Simultaneously with the NA extraction from biological material it is necessary to prepare a negative control and pass it through all stages of sample preparation.

For samples of biological material taken in transport medium or physiological solution, or prepared for NA extraction using physiological solution/distilled water, it is recommended to use transport medium or physiological solution/distilled water to prepare a negative control.

For other samples use negative control (NC) from the reagent kit.

6. Test samples and controls samples must be treated in a single pattern simultaneously according to these instructions.
7. Precipitation is allowed in the lysis solution. In case of precipitation heat the vial with lysis solution on the thermostat previously heated to 65 °C until complete dissolution of the precipitate. Then stir the solution by turning the vial upside down 5-10 times, avoiding foaming. Before use, cool the solutions to room temperature (18 °C to 25 °C). The precipitate can also be dissolved at room temperature (18 °C to 25 °C) for approximately 12 hours.
8. When the tubes are heated, the caps may open! Use tubes with locking caps (e.g. Eppendorf Safe-Lock Tubes) or programmable thermostats with a clamp lid (e.g. solid-state programmable small-size thermostat TT-1-“DNA-Technology”, manufactured by “DNA-Technology R&D”, LLC).

- Nucleic acid extraction

Preparation and NA extraction using PREP-NA reagent kit is performed according to Annexes A-D depending on the biomaterial, kit and applied method (Table 8):

Table 8.

Method	Biomaterial
Standard method according to Annex A	Amniotic liquid Bacterial cultures Biological material from fallen and diseased animals (smears and flushes from trachea, nasal cavity, oral cavity, cloaca) Bronchoalveolar lavage Vesicular fluid Gastric juice Liquor Blood leukocytes Smears from endotracheal tubes Phlegm Milk Urine Nasopharyngeal and endotracheal aspirate Blood plasma Pleural fluid Prostate secretion Synovial fluid Saliva Oropharyngeal and nasal flushes, flushes from endotracheal tubes Tuberculoma contents Smears/scrapes of epithelial cells from oropharynx, nasopharynx, gastrointestinal tract, urogenital tract, affected skin and erosive-ulcerous elements, epithelial cells (discharge) from conjunctiva of the eye Animal feces Human feces (meconium) Exudates Ejaculate
Short method according to Annex B	Smears/scrapes of epithelial cells from oropharynx, nasopharynx, gastrointestinal tract, urogenital tract Feces (meconium) Ejaculate Nails
Method for biopsy samples according to Annex D	Internal organs of animals Autopsy material Biopsy samples Tissue samples Punctate Flushes from fragments of venous catheter
After pretreatment using PREP-PK Standard method according to Annex A	Autopsy material Biopsy samples Tissue samples Punctate FFPE tissue

- **Storage and use of NA preparation**

8.2.1 The NA preparation may be stored at the temperature from 2 °C to 8 °C for no longer than two hours. For long-term storage, the NA preparation should be placed in a freezer and stored at a temperature not exceeding minus 18 °C for no longer than 7 days without thawing before use.

8.2.2 If only PCR DNA testing is intended, the NA preparation may be stored at the temperature from minus 18 °C to minus 22 °C for no longer than one month or at the temperature from minus 68 °C to minus 72 °C for no longer than one year.

WARNING! It is only allowed to thaw NA preparation once.

8.2.3 If the NA preparation has been stored at a temperature not exceeding minus 18 °C, before its use for PCR/RT-PCR it is necessary to thaw the NA preparation and negative control at room temperature (from 18 °C to 25 °C) or at a temperature from 2 °C to 8 °C.

8.2.4 Before using the NA preparation for PCR/RT-PCR after storage and/or thawing, shake tubes with NA preparation and negative control on vortex for 3-5 seconds and spin for 1-3 seconds.

9. SPECIFICATIONS

9.1 Minimum volume of biomaterial for NA extraction:

Biomaterial	Minimum volume
Amniotic liquid, bronchoalveolar lavage, gastric juice, liquor, phlegm (method 1), pleural fluid, saliva, synovial fluid	500 µL
Autopsy material, biopsy samples/punctate, tissue samples	Sample up to 5.0 mm in diameter (50-100 mg)
Prostate secretion, flushes from fragments of venous catheter, tuberculoma contents, ejaculate, milk, blood plasma	100 µL
Bacterial cultures, vesicular fluid, exudates taken into transport medium ¹ ; Smears from endotracheal tubes taken into transport medium; Smears/scrapes of epithelial cells from oropharynx, nasopharynx, gastrointestinal tract, urogenital tract, affected skin and erosive-ulcerous elements taken into transport medium; Nails taken into transport medium	100 µL
Internal organs and feces of animals	250 mg
Blood (to obtain leukocyte fraction)	500 µL
Phlegm (method 2), urine, flushes from endotracheal tubes, nasopharyngeal and endotracheal aspirates	1.0 mL
Oropharyngeal and nasal flushes	300 µL
Feces (meconium) for suspension ²	100 µL/mg
FFPE tissue ³	2-4 5.0 µm thick paraffin slices (approximate slice area 0.5-1.5 cm ²)

9.2 Functional characteristics of the kit

- purity of nucleic acid samples (A260/280) is 1.4-2.0;
- concentration of nucleic acids in 100 µL of preparation is in the range of 5.9-24.4 ng/µL of NA solution.

9.3 Performance of the kit

- For DNA extraction – 100% (99.05 - 100%) with 95% CI;
- For RNA extraction - 100 % (99.78-100%) with 95% CI.

¹ - DNA-Technology made STOR-F transport medium is recommended

² - sample pretreatment using PREP-L is possible

³ - sample pretreatment using PREP-PK

9.4 Compatible reagent kits:

Nucleic acid extraction kit can be used together with reagent kits for PCR/RT-PCR NA analysis.

10. QUALITY CONTROL

“DNA-Technology Research & Production”, LLC declares that the abovementioned products meet the provision of the Regulation (EU) 2017/746 of the European parliament and of the Council of 5 April 2017. The quality control procedures performed in accordance with ISO 9001:2015 and ISO 13485:2016:

- observation of quality management in manufacturing of IVDR products;
- creation of values for customers;
- maintenance of the best service quality and customer management.

Contact our official representative in EU by quality issues of **PREP-NA DNA/RNA Extraction Kit** and **PREP-NA PLUS DNA/RNA Extraction Kit**.

Technical support:

E-mail: hotline@dna-technology.ru

<https://www.dna-technology.com>

Manufacturer: "DNA-Technology Research & Production", LLC,

142281, Russia, Moscow Region,

Protvino, Zheleznodorozhnaya Street, 20

Phone/fax: +7(495) 640.17.71

E-mail: info@dna-technology.com

<https://www.dna-technology.com>

Seller: "DNA-Technology" LLC,

117587, Russia, Moscow,

int. ter. Municipal District Chertanovo Severnoye,

Varshavskoye shosse, 125 Zh, building 5, floor 1, office 12

Phone/fax: +7(495) 640.17.71

E-mail: info@dna-technology.com

<https://www.dna-technology.com>

Authorized representative in EU:

OBELIS S.A

Registered Address:

Bd. Général Wahis, 53

1030 Brussels, Belgium

Tel: +32.2.732.59.54

Fax: +32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

<http://www.obelis.net>

11. KEY TO SYMBOLS

	<i>In vitro</i> diagnostic medical device		Date of manufacture
	Temperature limit		Consult instructions for use
	Contains sufficient for <n> tests		Catalogue number
	Use-by date		Manufacturer
	Batch code		Version
	Non-sterile		Caution!
	Authorized representative in the European Community		Keep away from sunlight

REF

P-034-N/1EU
P-036-N/1EU
P-036-N/2EU

VER

1143.2025.02.13

ANNEX A

Standard method of NA extraction from biomaterial⁴

1. Mark the necessary amount of 1.5 mL plastic tubes (with locking caps, if necessary), considering a tube for negative control (C-).

Note. For samples pretreated with obtaining precipitate and supernatant (see Table 7) mark the tubes with 100 µL of samples prepared for the assay.

2. In case of using this reagent kit together with RT-PCR detection kits ("DNA-Technology TS", "DNA-Technology R&P") that have internal control RNA-IC "A" included, add 10 µL of RNA-IC "A" spun on vortex into the corresponding tubes. Close the tubes.
3. Add 300 µL of lysis solution into each tube. Do not touch the edges of the tube.
4. Add 100 µL of samples to each test tube (except for the tubes with samples with precipitate obtained during pretreatment (see Table 6) and C- tube).
5. Add 100 µL of transport medium, sterile physiological saline solution or negative control from the reagent kit into the C- tube.
6. Close the tubes tightly and shake on vortex for 3-5 seconds.
7. Thermostate the tubes at 65 °C for 15 minutes.
8. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 for 30 seconds.
9. Add 400 µL of precipitation buffer into each tube, shake on vortex for 3-5 seconds.
10. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 at room temperature (from 18 °C to 25 °C) for 15 minutes.
11. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
12. Add 450 µL of wash solution No. 1 to the precipitate, close the tubes and mix the contents by carefully turning the tubes upside down 3-5 times.
13. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 at room temperature (from 18 °C to 25 °C) for 5 minutes.
14. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
15. Add 300 µL of wash solution No. 2 to the precipitate, close the tubes and mix the contents by carefully turning the tubes upside down 3-5 times.
16. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 at room temperature (from 18 °C to 25 °C) for 5 minutes.
17. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
18. Open the tubes and dry the precipitate at 65 °C for 5 minutes.
19. Add 50 µL (for PREP-NA) or 300 µL (for PREP-NA PLUS) of dilution buffer to the precipitate.
WARNING! Dilution buffer is different for PREP-NA and PREP-NA PLUS. It is not allowed to use dilution buffer from another version of the kit.
20. Close the tubes and spin down the drops on vortex for 3-5 seconds.
21. Thermostate the tubes at 65 °C for 10 minutes. Shake the tubes on vortex for 3-5 seconds.
22. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 at room temperature (from 18 °C to 25 °C) for 30 seconds to spin down the condensate.
NA preparation is ready to be introduced into PCR-mix/RT-PCR-mix.

⁴ - types of biomaterial are listed in Table 8

ANNEX B

Short method of NA extraction from biomaterial⁵

1. Mark the necessary amount of 1.5 mL plastic tubes (with locking caps, if necessary), considering a tube for negative control (C-).

Note. For samples pretreated with obtaining precipitate and supernatant (see Table 7) mark the tubes with 100 µL of samples prepared for the assay

2. In case of using this reagent kit together with RT-PCR detection kits ("DNA-Technology TS", "DNA-Technology R&P") that have internal control RNA-IC "A" included, add 10 µL of RNA-IC "A" spun on vortex into the corresponding tubes. Close the tubes.
 3. Add 300 µL of lysis solution into each tube. Do not touch the edges of the tube.
 4. Add 100 µL of samples to each test tube (except for the tubes with samples with precipitate obtained during pretreatment (see Table 6) and C- tube).
 5. Add 100 µL of transport medium, sterile physiological saline solution or negative control from the reagent kit into the C- tube.
 6. Add 100 µL of transport medium, sterile physiological saline solution or negative control from the reagent kit into the C- tube.
 7. Thermostate the tubes at 65 °C for 5 minutes.
 8. Spin the tubes on vortex for 3-5 seconds.
 9. Add 400 µL of precipitation buffer into each tube, shake on vortex for 3-5 seconds.
 10. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 at room temperature (from 18 °C to 25 °C) for 10 minutes.
 11. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
 12. Add 450 µL of wash solution No. 1 to the precipitate, close the tubes and mix the contents by carefully turning the tubes upside down 3-5 times.
 13. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 at room temperature (from 18 °C to 25 °C) for 1 minute.
 14. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
 15. Add 300 µL of wash solution No. 2 to the precipitate, close the tubes and mix the contents by carefully turning the tubes upside down 3-5 times.
 16. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 at room temperature (from 18 °C to 25 °C) for 1 minute.
 17. Remove supernatant, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate. It is allowed to leave up to 20-30 µL of supernatant.
 18. Open the tubes and dry the precipitate at 65 °C for 5 minutes.
 19. Add 50 µL (for PREP-NA) or 300 µL (for PREP-NA PLUS) of dilution buffer to the precipitate.
- WARNING!** Dilution buffer is different for PREP-NA and PREP-NA PLUS. It is not allowed to use dilution buffer from another version of the kit.
20. Close the tubes and spin down the drops on vortex for 3-5 seconds.
 21. Thermostate the tubes at 65 °C for 5 minutes. Shake the tubes on vortex for 3-5 seconds.
 22. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 at room temperature (from 18 °C to 25 °C) for 30 seconds to spin down the condensate.

NA preparation is ready to be introduced into PCR-mix/RT-PCR-mix.

⁵ - types of biomaterial are listed in Table 8

ANNEX C

NA extraction from hard ticks

1. Mark the necessary amount of 1.5 mL plastic tubes (with locking caps, if necessary), considering a tube for negative control (C-).
2. Add 300 µL of lysis solution into each tube with hard tick (see Table 7) and C-. Do not touch the edges of the tube.
3. Add 100 µL of negative control into the C- tube.
4. Close the tubes tightly and shake on vortex for 3-5 seconds.
5. Thermostate the tubes at 65 °C for 1 hour, spin the tubes on vortex for 3-5 seconds.
6. Rub the tick with a homogenizer rod (separate rod for each tube).
7. Close the tubes tightly, shake on vortex for 3-5 seconds and spin for 3-5 seconds.
8. Transfer supernatant into the corresponding tubes for test samples. Do not transfer the supernatant into the C- tube.
9. Add 400 µL of precipitation buffer into each tube without touching the edges of the tube, close the tubes and shake on vortex for 3-5 seconds.
10. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 for 15 minutes.
11. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
12. Add 450 µL of wash solution No. 1 to the precipitate, close the tubes and mix the contents by carefully turning the tubes upside down 3-5 times.
13. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 for 5 minutes.
14. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
15. Add 300 µL of wash solution No. 2 to the precipitate, close the tubes and mix the contents by carefully turning the tubes upside down 3-5 times.
16. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 for 5 minutes.
17. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
18. Open the tubes and dry the precipitate at 65 °C for 5 minutes.
19. Add 50 µL of dilution buffer to the precipitate, close the tubes.
20. Spin down the drops on vortex for 1-3 seconds.
21. Thermostate the tubes at 65 °C for 10 minutes. Shake the tubes on vortex for 3-5 seconds.
22. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 for 30 seconds.

NA preparation is ready to be introduced into PCR-mix/RT-PCR-mix.

ANNEX D

NA extraction from biopsy samples and similar types of biomaterials; from venous catheter flushes⁶

1. Mark the necessary amount of 1.5 mL plastic tubes (with locking caps, if necessary), considering a tube for negative control (C-).
2. Add 300 µL of lysis solution into each tube with samples (see Table 7) and C-. Do not touch the edges of the tube.
3. Add 100 µL of transport medium, sterile physiological saline solution or negative control from the reagent kit into the C- tube. Close the tubes tightly and shake on vortex for 3-5 seconds.
4. Thermostate the tubes at 65 °C according to the table D.1, spin on vortex for 3-5 seconds

Table D.1

Biomaterial	Thermostating time, min
Autopsy material Biopsy samples Internal organs of animals Tissue samples Punctate	30
Flushes from fragments of venous catheter	15

5. Transfer supernatant into the corresponding tubes for test samples. Do not transfer the supernatant into the C- tube.
 6. Add 400 µL of precipitation buffer into each tube without touching the edges of the tube, close the tubes and shake on vortex for 3-5 seconds.
 7. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 for 15 minutes.
 8. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
 9. Add 450 µL of wash solution No. 1 to the precipitate, close the tubes and mix the contents by carefully turning the tubes upside down 3-5 times.
 10. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 for 5 minutes.
 11. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
 12. Add 300 µL of wash solution No. 2 to the precipitate, close the tubes and mix the contents by carefully turning the tubes upside down 3-5 times.
 13. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 for 5 minutes.
 14. Remove supernatant fully, using separate tip for each tube. Do not touch the precipitate.
 15. Open the tubes and dry the precipitate at 65 °C for 5 minutes.
 16. Add 50 µL of dilution buffer to the precipitate, close the tubes.
 17. Spin down the drops on vortex for 1-3 seconds.
 18. Thermostate the tubes at 65 °C for 10 minutes. Shake the tubes on vortex for 3-5 seconds.
 19. Centrifuge the tubes at RCF(g) 12,000-16,000 for 30 seconds.
- NA preparation is ready to be introduced into PCR-mix/RT-PCR-mix.

⁶ - types of biomaterial are listed in Table 8

**Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот
ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС****Формы комплектации: ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС****1 НАЗНАЧЕНИЕ**

1.1 Комплект реагентов ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС предназначен для получения препарата нуклеиновых кислот (НК) из биологического материала (таблица 1) для последующего анализа методом обратной транскрипции (РНК) и/или полимеразной цепной реакции (ДНК).

Комплектация ПРОБА-НК-ПЛЮС предназначена для получения большего объема ДНК (300 мкл) по сравнению с комплектацией ПРОБА-НК (50 мкл) с целью проведения в дальнейшем большего числа ПЦР-исследований.

1.2 Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА**2.1 Состав комплекта:**

Компонент	Количество			
	ПРОБА-НК-ПЛЮС		ПРОБА-НК	
• Лизирующий раствор	15 мл	1 флакон	30 мл	1 флакон
• Реагент для преципитации	20 мл	1 флакон	40 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №1	25 мл	1 флакон	50 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №2	15 мл	1 флакон	30 мл	1 флакон
• Буфер для растворения	15 мл	1 флакон	1,25 мл	4 пробирки
• Отрицательный контрольный образец	-	-	1,5 мл	2 пробирки
• Внутренний контрольный образец (РНК-ВК)	-	-	1,0 мл	1 пробирка
• Внутренний контрольный образец (ДНК-ВК)	-	-	1,0 мл	1 пробирка

ВНИМАНИЕ! Буфер для растворения различается для комплектаций ПРОБА-НК и ПРОБА-НК-ПЛЮС. Использовать буфер для растворения из другой комплектации **не допускается**.

2.2 Количество анализируемых образцов: комплект рассчитан на выделение НК из 50/100 анализируемых образцов, включая отрицательные контрольные образцы.

Т а б л и ц а 1

Комплектация	ПРОБА-НК	ПРОБА-НК-ПЛЮС
Каталожный номер	[REF] P-002/1	[REF] P-002/2
Материал для исследования	Плазма крови, слюна, мокрота, молоко, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, мазки и смывы из полости носа и ротоглотки, фекалии, материал от падших и больных животных (мазки и смывы из трахеи, полости носа, глотки, клоаки; фекалии; внутренние органы) и др.	Плазма крови, слюна, мокрота, молоко, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища и др.
Количество определений	100	50

ВНИМАНИЕ! При работе с наборами реагентов:

- ОТ-ГЕПАТОГЕН-С;
 - ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИПИРОВАНИЕ (формат «Real-Time»);
 - ВИЧ-ГЕН;
 - ВГБ-ГЕН;
 - набором реагентов для выявления РНК вируса гриппа А субтипа H5N1 («птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1)
- необходимо использовать **только** комплектацию ПРОБА-НК.

2.3 Время проведения выделения нуклеиновых кислот – 1 час.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», МУ 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19», с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Неизвестные образцы рассматриваются как потенциально опасные.

Отходы биоматериала (инфицированные или потенциально инфицированные), образцы после пробоподготовки, образующиеся в клинико-диагностических лабораториях, относятся к классу В и утилизируются в соответствии с требованиями 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-противоэпидемиологических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09.

П р и м е ч а н и е - Комплект реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

4 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

При работе с комплектом реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 25 °С до 98 °С;
- центрифуга для микропробирок, с RCF(g) не ниже 12000;
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- электрический лабораторный аспиратор с колбой-«ловушкой»;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости 20–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объемом 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда для биопроб (ООО «НПО ДНК-Технология») и/или физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

При выделении НК из плазмы:

- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА или цитратом натрия.

При выделении НК из мокроты (способ 1):

- 10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия $\times 12\text{H}_2\text{O}$;
- 1М раствор HCl;
- 5% раствор хлорамина;
- вода дистиллированная.

При выделении НК из мокроты (способ 2): муколизин.

5 ВЗЯТИЕ И ПОДГОТОВКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

5.1 Плазма крови

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

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

5.1.1 Центрифугируйте пробирку с кровью при RCF(g) 900 в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

5.1.2 После центрифугирования отберите полуавтоматическим дозатором верхнюю фракцию (плазма) и перенести в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

ВНИМАНИЕ!

1. Время от момента взятия периферической крови до получения плазмы не должно превышать 6 часов. При необходимости плазму допускается хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 3 месяцев.
2. Перед выделением НК плазму необходимо перемешать!

5.2 Мокрота

ВНИМАНИЕ! При работе с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека, включая коронавирус SARS-CoV-2, методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), предобработку мокроты следует проводить с использованием муколизина (способ 2).

5.2.1 Способ 1

5.2.1.1 Примерно 500 мкл биологического материала перенесите в стерильную посуду.

5.2.1.2 Добавьте к пробе мокроты равный объем 10% трехзамещенного фосфорнокислого натрия $\times 12\text{H}_2\text{O}$, плотно закройте крышкой и интенсивно встряхните.

5.2.1.3 Смесь инкубируйте при температуре 37 °С в течение 18–24 часов, затем нейтрализуйте 1М HCl до pH 6,8–7,4.

5.2.1.4 Центрифугируйте при RCF(g) 100 в течение 20 мин.

5.2.1.5 Слейте надосадочную жидкость в ёмкость с 5% раствором хлорамина для обеззараживания.

5.2.1.6 Добавьте к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешайте пипетированием и перенесите в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

5.2.1.7 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

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

5.2.2 Способ 2

5.2.2.1 В контейнер с образцом добавьте муколизин в соотношении 5:1 (5 частей муколизина к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера.

5.2.2.2 Закройте крышку контейнера, встряхните содержимое и инкубируйте 20–30 мин при комнатной температуре, каждые 2–3 мин встряхивая контейнер.

Обработанную мокроту допускается хранить в контейнере в течение суток при температуре от 2 °С до 8 °С или длительно при температуре не выше минус 16 °С (в случае необходимости повторного выделения РНК/ДНК).

5.3 Соскобы эпителиальных клеток

5.3.1 Перенесите соскоб эпителиальных клеток (с задней стенки глотки, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала и др.) с помощью одноразового стерильного зонда в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл с транспортной средой (или с 500 мкл физиологического раствора стерильного), и тщательно прополощите зонд, избегая разбрызгивания жидкости. Затем извлеките зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости.

5.3.2 Полностью удалите зонд из пробирки. Пробирку плотно закройте и промаркируйте.

ВНИМАНИЕ! При работе с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека, включая коронавирус SARS-CoV-2, методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), в ходе подготовки соскобов из носоглотки и ротоглотки дальнейшее центрифугирование не требуется, образцы готовы для выделения РНК.

5.3.3 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

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

П р и м е ч а н и е . Перед взятием соскоба из цервикального канала необходимо удалить слизь стерильным ватным тампоном.

5.4 Моча

5.4.1 Порцию утренней мочи (примерно 50 мл) соберите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

5.4.2 Перенесите 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

5.4.3 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.4.4 Наиболее полно удалите надосадочную жидкость.

5.4.5 Добавьте к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного.

5.4.6 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

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

5.5 Слюна, ливор, синовиальная жидкость

5.5.1 Слюну, ливор, синовиальную жидкость (примерно 500 мкл) соберите в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

5.5.2 Перенесите 500 мкл материала в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

5.5.3 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

5.5.4 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок+жидкая фракция).

5.5.5 Добавьте к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного.

5.5.6 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

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

5.6 Сперма, секрет предстательной железы

5.6.1 Перенесите 100 мкл жидкого материала пипеткой в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с транспортной средой (или с 500 мкл физиологического раствора стерильного), встряхните пробирку на вортексе в течение 5–10 с.

5.6.2 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

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

5.7 Молоко

5.7.1 Соберите материал в стерильную посуду и плотно закройте крышкой.

5.7.2 Аккуратно перемешайте и перенесите 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

Срок сбора молока не более 24 часов. Хранение в течение всего срока сбора при температуре от 2 °C до 8 °C.

5.8 Мазки и смывы

ВНИМАНИЕ! При работе с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека, включая коронавирус SARS-CoV-2, методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), подготовка мазков в транспортной среде и смывов не требуется, образцы готовы для выделения РНК.

5.8.1 Центрифугируйте пробирку, содержащую анализируемый материал, при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

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

5.9 Фекалии

5.9.1 Перенесите ~250 мг (мкл) фекалий в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с 1,0 мл физиологического раствора стерильного.

5.9.2 Встряхните пробирку на вортексе в течение 5–10 с.

5.9.3 Центрифугируйте пробирку при RCF(g) 100 в течение 2–3 мин.

5.9.4 Перенесите 800–1000 мкл надосадочной жидкости в новую пробирку объёмом 1,5 мл, центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 10 мин.

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

5.10 Внутренние органы животных

5.10.1 Поместите ~250 мг исследуемого материала в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

5.10.2 Добавьте 1,0 мл физиологического раствора стерильного.

5.10.3 Встряхните пробирку на вортексе в течение 3–5 сек, центрифугируйте пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 3–5 сек.

5.10.4 Удалите надосадочную жидкость.

Полученный материал готов для выделения НК.

5.11 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Транспортировать и хранить образцы биологического материала до начала исследования следует при температуре от 2 °C до 8 °C не более 24 часов. Допускается хранить полученный материал при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C не более 3 месяцев.

6 ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

П р и м е ч а н и е . В лизирующем растворе допускается выпадение осадка. Перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 65 °C в течение 10 мин.

6.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-» по одной пробирке объёмом 1,5 мл.

П р и м е ч а н и е . Для образцов, прошедших предобработку с получением осадка и надосадочной жидкости (см. 5: мокрота – способ 1, слюна, моча, ливор, сперма, секрет предстательной железы, мазки и смывы; фекалии), маркируются пробирки с подготовленным для исследования материалом в объёме 100 мкл.

6.2 В случае, если предусмотрено использование ВК, внесите во все промаркированные пробирки по 10 мкл предварительно перемешанного внутреннего контрольного образца в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов для проведения ПЦР/ОТ-ПЦР.

ВНИМАНИЕ!

1. При работе с наборами реагентов для выявления нуклеиновых кислот возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека, включая коронавирус SARS-CoV-2, методом ОТ-ПЦР (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия), используется внутренний контрольный образец из соответствующего набора реагентов. Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) и внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) из комплекта реагентов ПРОБА-НК в этом случае не используются.

2. При одновременном исследовании образца на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами (HCV, HTV) и ДНК-содержащими вирусами (HBV), необходимо на стадии пробоподготовки внести два внутренних контроля (РНК-ВК + ДНК-ВК).

6.3 Внесите в каждую пробирку 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь её края.

6.4 Внесите по 100 мкл подготовленного биоматериала в пробирки для исследуемых образцов (за исключением пробирок с образцами, прошедшими предобработку с получением осадка (6.1), и пробирки «К-»).

6.5 В пробирку, маркированную «К-», внесите 100 мкл отрицательного контрольного образца (комплектация ПРОБА-НК), транспортный среды или физиологического раствора стерильного (комплектация ПРОБА-НК-ПЛЮС). Плотно закройте крышки пробирок, встряхните на вортексе в течение 3–5 с.

- 6.6** Термостатируйте пробирки при 65 °С в течение 15 мин, центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 30 с.
- ВНИМАНИЕ!** При выделении РНК вируса гриппа А из тканей внутренних органов животных необходимо термостатировать пробирки при 65 °С в течение 30 мин, осадить конденсат центрифугированием на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и перенести надосадочную жидкость в новую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
- 6.7** Добавьте 400 мкл реагента для преципитации и встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- Примечание** - При выделении НК HCV, HBV и HIV пробирки необходимо встряхнуть на вортексе дважды.
- 6.8** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 15 мин.
- 6.9** Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.10** Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и 3-5 раз аккуратно переверните пробирки.
- 6.11** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 5 мин.
- 6.12** Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.13** Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и 3-5 раз аккуратно переверните пробирки.
- 6.14** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 5 мин.
- 6.15** Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.16** Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65 °С в течение 5 мин.
- 6.17** Добавьте к осадку 50 мкл (комплектация ПРОБА-НК) или 300 мкл (комплектация ПРОБА-НК-ПЛЮС) буфера для растворения, закройте крышки пробирок.

ВНИМАНИЕ!

1. Буфер для растворения различается для комплектиций ПРОБА-НК и ПРОБА-НК-ПЛЮС. Использовать буфер для растворения из другой комплектиции не допускается.
 2. При исследовании клинического материала на наличие инфекций, вызванных только РНК-содержащими вирусами (при работе с наборами ОТ-ГЕПАТОГЕН-С, ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, ВИЧ-ГЕН), рекомендуется растворять осадок в 16,5 мкл буфера для растворения, так как увеличение объема буфера для растворения приводит к пропорциональному разбавлению образца и уменьшению чувствительности анализа.
 3. При работе с набором ВГБ-ГЕН, а также при одновременном исследовании образца на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами (HCV, HIV) и ДНК-содержащими вирусами (HBV), необходимо растворить осадок в 25 мкл буфера для растворения.
 - 6.18** Осадите капли центрифугированием пробирок на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
 - 6.19** Прогрейте пробирки при 65 °С в течение 10 мин. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- ВНИМАНИЕ!** При выделении НК HCV, HBV и HIV пробирки не встряхивать!
- 6.20** Центрифугируйте пробирки при RCF(g) 12000 - 16000 в течение 30 с.
- Препарат НК готов для постановки реакции обратной транскрипции (РНК) или проведения ПЦР (ДНК).

Примечания:

1. Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции. Препарат РНК не подлежит хранению.
2. Препарат ДНК можно хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца или при температуре от минус 68 °С до минус 72 °С не более одного года.

7 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

7.1 Транспортирование

Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 8 °С. Комплекты реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

7.2 Хранение

Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности комплекта.

Комплекты реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

7.3 Указания по эксплуатации

Комплект реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

После вскрытия упаковки компоненты комплекта реагентов следует хранить при следующих условиях:

- компоненты комплекта реагентов следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности комплекта.

8 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 8.1** При использовании комплекта 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.
- 8.2** Комплекты 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.

9 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

- 9.1** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплекта требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 9.2** Срок годности комплекта - 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

10 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС), 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.

Адрес производителя:

ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства:

1) ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 3.

2) ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.