

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Альфалаб»


М.А.Суворова
 **2018 г.**

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления в клиническом материале
ДНК *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum*
и их дифференциации
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени
«Уреаплазма-тест»

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	3
2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ.....	3
2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА	3
2.2. ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
2.3. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
2.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
4. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ.....	6
5. ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	8
6. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	8
6.1. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.....	8
6.2. ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ.....	8
6.3. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	9
6.4. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	10
7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА.....	11
8. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	12
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	13
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	13

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «Уреаплазма-тест» предназначен для качественного обнаружения ДНК *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum* и их дифференциации методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Исследование на наличие ДНК *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum* проводится для выявления возбудителя уреаплазменной инфекции. Уреаплазменная инфекция, вызванная *Ureaplasma parvum*, и уреаплазменная инфекция, вызванная *Ureaplasma urealyticum*, имеют схожие клинические проявления. Однако для выбора оптимальной терапевтической стратегии необходимым условием является определение видовой принадлежности уреаплазм, которое возможно только на основе молекулярно-генетических методов, в частности, метода ПЦР. Таким образом, своевременное выявление и одномоментная дифференциация *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum* способствуют достижению максимального терапевтического эффекта и снижают риск развития хронического уретрита, бесплодия и других возможных осложнений уреаплазменной инфекции.

Материалом для исследования являются мазки из урогенитального тракта человека. Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика, научные исследования. Только для исследований *in vitro*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ образцов включает следующие этапы:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК из образцов клинического материала).
2. Амплификация специфических фрагментов ДНК в ходе ПЦР-реакции.
3. Детекция продуктов амплификации в режиме реального времени.

В процессе реакции происходит амплификация фрагмента ДНК *Ureaplasma parvum* и/или *Ureaplasma urealyticum* (при условии наличия указанных микроорганизмов в исходном клиническом материале) и амплификация фрагмента гена β -глобина человека (что служит в качестве контроля взятия биологического материала). Для амплификации специфических участков ДНК используются олигонуклеотиды и меченые олигонуклеотидные зонды Taqman. В присутствии фермента Taq-полимеразы происходит гибридизация олигонуклеотидов и зонда с комплементарным участком ДНК-мишени. Образование специфического продукта амплификации сопровождается отщеплением

флуоресцентной метки (благодаря наличию у Taq-полимеразы 5'-экзонуклеазной активности) и появлению детектируемого флуоресцентного сигнала, регистрация которого проводится в режиме реального времени. Олигонуклеотидные зонды, используемые для детекции ДНК возбудителей уреоплазменной инфекции и детекции фрагмента ДНК человека (внутренний контроль), имеют флуоресцентные метки с разными спектрами поглощения и испускания, что позволяет проводить одновременную регистрацию флуоресценции по трём каналам (FAM, ROX и HEX). Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству продуктов амплификации и, следовательно, нарастает с каждым последующим циклом.

Набор предназначен для использования на амплификаторах детектирующих для постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (MiniOpticon, BioRad; ДТ-96, ДНК-технология или другие амплификаторы с аналогичными техническими характеристиками).

2.2. ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.

Набор реагентов «Уреоплазма-тест» выпускается в четырех различных вариантах комплектации, которые отличаются по количеству определений, на которое рассчитан набор (48/96), и типу пробирок со смесью для амплификации (пробирки/стрипы):

- 1) комплект на 48 определений, смесь для амплификации в пробирках;
- 2) комплект на 48 определений, смесь для амплификации в стрипах;
- 3) комплект на 96 определений, смесь для амплификации в пробирках;
- 4) комплект на 96 определений, смесь для амплификации в стрипах;

2.3. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

На 48 определений:

Компонент набора реагентов	Описание	Объем, мкл	Количество
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная жидкость	10,0	48 пробирок объемом 0,2 мл или 6 стрипов по 8 пробирок объемом 0,2 мл каждая
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная жидкость	300,0	2 пробирки объемом 0,5 мл
Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная жидкость	75,0	1 пробирка объемом 0,5 мл
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная жидкость	150,0	1 пробирка объемом 0,5 мл

Комплект на 48 определений позволяет провести анализ 48-ми образцов, включая контроли.

На 96 определений:

Компонент набора реагентов	Описание	Объем, мкл	Количество
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная жидкость	10,0	96 пробирок объемом 0,2 мл или 6 стрипов по 8 пробирок объемом 0,2 мл каждая
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная жидкость	300,0	4 пробирки объемом 0,5 мл
Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная жидкость	75,0	2 пробирки объемом 0,5 мл
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная жидкость	150,0	2 пробирки объемом 0,5 мл

Комплект на 96 определений позволяет провести анализ 96-ти образцов, включая контроли.

2.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность. Нижний предел аналитической чувствительности набора реагентов – 1000 копий/мл. Для определения аналитической чувствительности используют контрольные образцы предприятия (КОП), представляющие собой полученные методом генной инженерии образцы плазмидной ДНК со встроенным фрагментом, специфичным для ДНК детектируемого микроорганизма. Концентрацию КОП измеряют спектрофотометрически на приборе NanoDrop2000.

Аналитическая специфичность. Аналитическая специфичность набора реагентов «Уреаплазма-тест» подтверждена отсутствием регистрации экспоненциального роста флуоресцентного сигнала по каналам FAM и ROX в отрицательных контрольных образцах, а также отсутствием флуоресцентного сигнала по каналу FAM в образцах, содержащих ДНК *Ureaplasma urealyticum* и отсутствием флуоресцентного сигнала по каналу ROX в образцах, содержащих ДНК *Ureaplasma parvum*.

Специфичность анализа при постановке теста с применением набора «Уреаплазма-тест» доказана методом секвенирования продуктов амплификации и подтверждена отсутствием неспецифических перекрестных реакций при тестировании образцов ДНК человека и панели образцов ДНК микроорганизмов, являющихся представителями нормальной микрофлоры урогенитального тракта, условно-патогенной и патогенной флоры (*Lactobacillus* spp, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*).

Диагностическая чувствительность набора реагентов подтверждена в ходе клинических испытаний на выборке клинических образцов и составляет не менее 98 % (при расчете по формуле Бернулли с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая специфичность набора реагентов по результатам клинических испытаний составила 97,72% для *Ureaplasma parvum* и 97,95% для *Ureaplasma urealyticum*. Диагностическую специфичность рассчитывали с учётом видовой принадлежности - отдельно для *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum*; расчёт производили по формуле Бернулли с доверительной вероятностью 90%.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 3.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).
- 3.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 3.3. Меры предосторожности - соблюдение правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и 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».
- 3.4. Утилизация отходов производится в соответствии с СанПиН N2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», сбор отходов осуществляется в одноразовые пакеты желтого цвета, предназначенные для утилизации медицинских отходов класса Б (ГОСТ Р 50962-96).

4. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение ДНК из клинического материала

ВНИМАНИЕ! Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала не входит в состав набора

Для выделения ДНК из клинических образцов используются наборы реагентов, рекомендованные для использования в клинической лабораторной диагностике при анализе мазков из урогенитального тракта («ДНК-сорб-АМ», ООО «Некст-Био», Россия; «ЭДЭМ», НТК «Диаэм», Россия; «ДНК-ЭКСПРЕСС», НПФ «Литех», Россия и другие аналогичные комплекты реагентов). Экстракцию ДНК проводят согласно инструкции производителя набора реагентов.

Необходимое оборудование:

- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 3000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Термит (ООО НПФ «ДНК-технология», Россия), поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5 – 10; 20-200 мкл;
- емкость для дезинфицирующего раствора для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующий раствор;
- отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки резиновые или пластиковые, одноразовые по МУ 1.3.2569-09.

2-й этап – проведение ПЦР-амплификации и детекция продуктов амплификации в режиме реального времени с помощью набора реагентов «Уреаплазма-тест»

Необходимое оборудование:

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- штатив «рабочее место» для стрипованных и обычных пробирок объемом 0,2 мл;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5 – 10; 20-200 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки резиновые или пластиковые, одноразовые по МУ 1.3.2569-09;
- емкость для дезинфицирующего раствора для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующий раствор;

- термостат программируемый (амплификатор) для проведения ПЦР с детекцией флуоресценции по двум каналам FAM, ROX и HEX в режиме «реального времени».

5. ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования являются мазки из урогенитального тракта человека. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала должно проводиться в строгом соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, 2012 г.

Условия и срок хранения образцов биоматериала определяется типом транспортной среды, использованной для забора мазков.

6. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции (выделения) ДНК из клинических образцов используются наборы реагентов, рекомендованные для использования в клинической лабораторной диагностике при анализе мазков из урогенитального тракта («ДНК-сорб-АМ», ООО «Некст-Био», Россия; «ЭДЭМ», НТК «Диаэм», Россия; «ДНК-ЭКСПРЕСС», НПФ «Литех», Россия и другие аналогичные комплекты реагентов). Экстракцию ДНК проводят согласно инструкции, прилагаемой к набору для выделения ДНК.

Полученные образцы ДНК хранят в течение 1 недели при температуре от 2 до 8°C или в течение года при температуре не выше минус 16°C.

6.2. ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 5 мкл.

6.2.1. В штатив поставить необходимое количество пробирок/стрипов со смесью для амплификации (в соответствии с количеством проб и две пробирки для ПКО и ОКО);

6.2.2. В каждую пробирку, не повреждая слой воска, внести по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы;

6.2.3. Закрыць крышкі пробірок;

6.2.4. Поочередно открывая крышкі пробірок внести в пробірки:

6.2.4.1. В одну из подготовленных пробірок внести 5 мкл ОКО;

6.2.4.2. В пробірки, предназначенные для анализа образцов, поочередно внести по 5 мкл анализируемых проб;

6.2.4.3. В оставшуюся пробірку внести 5 мкл ПКО.

6.2.5. Установить все пробірки в блок детектирующего амплификатора;

6.2.6. Запустить программу амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 1.

Внимание! Для предотвращения контаминации при внесении в пробірки реагентов, образцов ДНК и контрольных образцов рекомендуется использовать только одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами.

Таблица 1 – Условия проведения амплификации и детекции результатов

Программа амплификации		
Температура	Время	Количество циклов
94°C	15 мин	1
94°C	10 сек	5
58°C	10 сек	
72°C	10 сек	
94°C	10 сек	40
58°C	10 сек*	
72°C	05 сек	
10°C – хранение		
Детекция флуоресцентного сигнала		
Специфические продукты	FAM и ROX	
Внутренний контроль	HEX	

* - детекция флуоресцентного сигнала

6.3. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Детекция продуктов амплификации проводится в режиме реального времени с использованием детектирующего ПЦР-амплификатора согласно инструкции к прибору.

- по каналу FAM регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Ureaplasma parvum*;
- по каналу ROX регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Ureaplasma urealyticum*;

- по каналу HEX регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента гена β -глобина человека (используется в качестве контроля взятия материала).

6.4. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.4.1. Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на соответствующем канале с пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла C_t . Анализируемая проба считается положительной, если:

- график нарастания флуоресценции имеет форму экспоненциальной кривой;
- для пробы определено значение порогового цикла C_t по каналам FAM, ROX и HEX;
- кривая флуоресценции по каналам FAM, ROX и HEX пересекает пороговую линию на участке экспоненциального роста.

Принцип интерпретации:

6.4.2. Принцип интерпретации:

Учет результатов следует начинать с результатов амплификации положительного (ПКО) и отрицательного контрольных (ОКО) образцов.

6.4.2.1. Результаты анализа не учитываются, если:

- Во время прохождения реакции детектирующий амплификатор **не регистрирует** экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM, ROX и HEX в пробирке с ПКО или полученные значения порогового цикла C_t для одного или всех каналов выше граничных, указанных во вкладыше к набору; **в данной ситуации необходимо повторное исследование всех образцов;**
- Во время прохождения реакции детектирующий амплификатор **не регистрирует** экспоненциальный рост уровня флуоресценции по одному из каналов в пробирке с ПКО или полученные значения порогового цикла C_t выше граничных, указанных во вкладыше к набору; **в данной ситуации необходимо повторное исследование всех образцов;**
- В пробирке с ОКО **регистрируется** экспоненциальный рост уровня флуоресценции по одному из каналов, либо по всем каналам флуоресценции. **Необходимо принятие**

мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов.

- В пробирке с ПКО регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM, ROX и HEX; в пробирке с ОКО не регистрируется рост уровня флуоресценции по каналам FAM, ROX и HEX; в пробирке с анализируемым образцом не регистрируется рост уровня флуоресценции по каналу HEX или значение порогового цикла C_t превышает граничное значение 33,0; для такого образца процедура исследования должна быть проведена повторно, начиная со стадии выделения ДНК. При повторении результата делается вывод о плохом качестве взятия клинического материала, образец должен быть взят повторно.

6.4.2.2. Результаты анализа учитываются, если:

- Во время прохождения амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM, ROX и HEX в пробирке с положительным контрольным образцом;
- Во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по каналам FAM, ROX и HEX в пробирке с отрицательным контрольным образцом;

6.4.2.3. При соблюдении требований пункта 6.4.2.2. заключение о наличии либо отсутствии в анализируемом клиническом образце ДНК *Ureaplasma parvum* и/или ДНК *Ureaplasma urealyticum* делается в соответствии с Таблицей 2.

Таблица 2 – Интерпретация результатов исследования

	Наличие флуоресцентного сигнала		
	Канал FAM	Канал ROX	Канал HEX
Образец положителен на наличие ДНК <i>Ureaplasma parvum</i>	+	-	+
Образец положителен на наличие ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	+	+
Образец положителен на наличие ДНК <i>Ureaplasma parvum</i> и ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i>	+	+	+
Образец отрицателен на наличие ДНК <i>Ureaplasma parvum</i> и ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	-	+
Результат недостоверный	-	-	-
	+	+	-

7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА

7.1. Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.

7.2. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

7.3. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

7.4. Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности набора.

7.5. Условия хранения отдельных компонентов набора «Уреаплазма-тест» указаны на упаковке. Пробирки и стрипы со смесями для амплификации необходимо хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Раствор Таq-полимеразы, ПКО и ОКО необходимо хранить при температуре от 2 до 8 °С.

7.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

7.7. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

8. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

8.1. Наборы, потерявшие свои потребительские качества в результате ненадлежащего хранения, а также наборы и их компоненты с истёкшим сроком годности подлежат утилизации в соответствии с СанПиН N2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», сбор отходов осуществляется в одноразовые пакеты желтого цвета, предназначенные для утилизации медицинских отходов класса Б (ГОСТ Р 50962-96).

8.2. Упаковка набора относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО «Альфалаб», 197376, Санкт Петербург, ул. Академика Павлова 14а, info@alphalabs.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

ПЦР - полимеразная цепная реакция.

ПКО - положительный контрольный образец

ОКО - отрицательный контрольный образец

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ:



Номер серии



Только для *in vitro* диагностики



Дата изготовления



Срок годности



Хранить при температуре

Прошито и пронумеровано 13 листов
В количестве _____

Генеральный директор ООО «Альфалаб»
Суворова М.А.

