

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Альфалаб»

 **М.А. Суворова**
« » **2017 г.**

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Mycoplasma genitalium* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

«Микоплазма гениталиум»

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 реагентов «Микопlasма гениталиум» предназначен для качественного обнаружения ДНК *Mycoplasma genitalium* в образцах биоматериала человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме реального времени. *Mycoplasma genitalium* – грамотрицательный микроорганизм, поражающий в основном мочеполовую систему, где паразитирует, прикрепляясь к клеткам эпителия.

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика микоплазменной инфекции, вызванной *Mycoplasma genitalium*, научные исследования. Материалом для исследования являются мазки из уrogenитального тракта человека. 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 ПЦР-реакции происходит амплификация фрагмента ДНК *Mycoplasma genitalium* (при условии наличия указанного микроорганизма в исходном клиническом материале) и амплификация фрагмента гена β -глобина человека (что служит в качестве контроля взятия биологического материала). Для амплификации специфического участка ДНК используются олигонуклеотиды и флуоресцентно меченные 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 появлением детектируемого флуоресцентного сигнала, регистрация которого проводится в режиме реального времени. Олигонуклеотидные зонды, используемые для детекции ДНК *Mycoplasma genitalium* и детекции фрагмента ДНК человека (внутренний контроль), имеют флуоресцентные метки с разными спектрами поглощения и испускания, что позволяет проводить одновременную регистрацию флуоресценции по двум каналам (FAM и HEX). Интенсивность

флуоресценции прямо пропорциональна количеству продуктов амплификации и, следовательно, нарастает с каждым последующим циклом.

Набор реагентов 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 «Микопlasма гениталиум» 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 0,6 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 положительный и отрицательный контрольные образцы.

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 0,6 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 положительный и отрицательный контрольные образцы.

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 «Микоплазма гениталиум» подтверждена отсутствием регистрации экспоненциального роста флуоресцентного сигнала по каналу FAM в отрицательных контрольных образцах.

Специфичность анализа при постановке теста с применением набора «Микоплазма гениталиум» 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*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*).

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

Диагностическая специфичность. Диагностическая специфичность рассчитывается на основе данных, полученных в ходе клинических испытаний на выборке клинических образцов; расчёт показателя производится по формуле Бернулли с доверительной вероятностью 90%.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1. Потенциальный риск применения набора реагентов – класс 2Б (Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).

3.2. Все компоненты набора реагентов 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 «Микопlasма гениталиум»

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 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 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 Таq-полимеразы;

6.2.3. Закрыть крышки пробирок;

6.2.4. Поочередно открывая крышки пробирок внести в пробирки:

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

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

6.2.4.3. В оставшуюся пробирку внести 5 мкл ПКО.

6.2.5. Установить все пробирки 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 пробирки 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		
Специфический продукт	FAM	
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 *Mycoplasma genitalium*;
- 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 и HEX;
- кривая флуоресценции по каналам FAM и HEX пересекает пороговую линию на участке экспоненциального роста.

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 и HEX в пробирке с ПКО или полученные значения порогового цикла C_t для одного или обоих 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 и HEX; в пробирке с ОКО **не регистрируется** рост уровня флуоресценции по каналам FAM 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 и HEX в пробирке с положительным контрольным образцом;
- Во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по каналам FAM 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 *Mycoplasma genitalium* делается в соответствии с Таблицей 2.

Таблица 2 – Интерпретация результатов исследования

	Наличие флуоресцентного сигнала	
	Канал FAM	Канал HEX
Образец положителен на наличие ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i>	+	+
Образец отрицателен на наличие ДНК <i>Mycoplasma genitalium</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 от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

7.5. Условия хранения отдельных компонентов набора «Микоплазма гениталиум» 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 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», 197022, 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 _____
В количестве _____ листов

Генеральный директор ООО «Альфалаб»

Суворова М.А.

