

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
Общества с ограниченной ответ-
ственностью «НекстБио»



В. М. Трухан

2015 г.

ИЗВЕЩЕНИЕ ОБ ИЗМЕНЕНИИ № 2/012-2015

Инструкции по применению

**набора реагентов для определения ДНК *Chlamydia trachomatis* и
Mycoplasma genitalium методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для
диагностики in vitro «АмплиПрайм® CT/MG»**

ООО «НекстБио» 09286667	2/012-2015	Инструкции по применению набора реагентов для определения ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> и <i>Mycoplasma genitalium</i> методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® CT/MG»
Дата выпуска 21.08.2015	Лист 2	Листов 7

ПРИЧИНА	1. В разделе <u>Принцип метода</u> уточнена фраза об инаktivации УДГ	Код 3
	2. В разделе <u>Аналитические характеристики</u> изменены значения аналитической чувствительности для микроорганизма <i>M. Genitalium</i> в образцах отделяемого конъюнктивы.	Код 5
	3. В разделе <u>Диагностические характеристики</u> изменены значения диагностических характеристик (специфичности и чувствительности) на значения, полученные в результате клинико-лабораторных испытаний, с доверительной вероятности 95%	Код 5
	4. В разделе <u>Меры предосторожности</u> формулировки «всегда следует» и «следует рассматривать» заменены на «необходимо всегда» и «рассматривать»	Код 7
	5. В разделе <u>Меры предосторожности</u> дополнены сведения об описании утилизации или уничтожения упаковки, биологического материала, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом с отдельным описанием правил	Код 3
	6. В разделе <u>Дополнительные материалы и оборудование</u> уточнено, что комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК должен соответствовать инструкции Производителя	Код 3
	7. В разделе <u>Взятие, транспортировка и хранение исследуемого материала</u> добавлено описание действий в случае невозможности обломить рабочую часть зонда	Код 3
	8. В разделе <u>Взятие, транспортировка и хранение исследуемого материала</u> исправлены стилистические ошибки	Код 7
	9. В разделе <u>Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК</u> формулировка «12 об/мин» заменена на «12 тыс об/мин»	Код 7
	10. В разделе <u>Формы комплектации 1, 2, 3 «Амплификация с детекцией по «конечной точке»</u> добавлено описание постановки отрицательного контроля в случае, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»	Код 3
	11. В разделе <u>Формы комплектации 1, 2, 3 «Амплификация с детекцией по «конечной точке»</u> в таблицах 7 и 11 формулировка « <u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения» заменена на «Не учитывается»	Код 3
	12. В разделе <u>Формы комплектации 1, 2, 3 «Возможные ошибки»</u> добавлено описание действий в случае, если для ОК отсутствует сигнал по каналу для флуорофора ROX.	Код 3
	13. В разделе <u>Формы комплектации 1, 2, 3 «Возможные ошибки»</u> исправлены стилистические ошибки	Код 7

ООО «НекстБио» 09286667	2/012-2015	Инструкции по применению набора реагентов для определения ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> и <i>Mycoplasma genitalium</i> методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® СТ/МГ»
Дата выпуска 21.08.2015		Лист 3
		Листов 7

ИЗМ.	СОДЕРЖАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ																							
1	Раздел «Принцип метода» Стр. 4 Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С. УДГ полностью инактивируется на первом шаге термоциклирования во время прогрева при температуре 95 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР. и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР. Изменение ввести заменой стр. 4 инструкции по применению																							
2	Раздел «Аналитические характеристики» Стр. 6 <table><tr><th>Вид исследуемого материала</th><th>Транспортная среда</th><th>Комплект для экстракции ДНК</th><th>Микроорганизм</th><th>Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл</th></tr><tr><td>....</td><td>...</td><td>....</td><td>....</td><td>.....</td></tr><tr><td rowspan="4">отделяемое конъюнктивы</td><td rowspan="2">«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»³</td><td rowspan="2">«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»</td><td><i>C. trachomatis</i></td><td>5x10²</td></tr><tr><td><i>M. genitalium</i></td><td>1x10³ Не применяется⁴</td></tr><tr><td rowspan="2">«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ»³</td><td rowspan="2">«АмплиПрайм ЭДЭМ»</td><td><i>C. trachomatis</i></td><td>5x10²</td></tr><tr><td><i>M. genitalium</i></td><td>1x10³ Не применяется⁴</td></tr></table> Добавлена ссылка 4: 4. Выявление данного микроорганизма в указанном виде биоматериала не имеет клинического значения. Изменение ввести заменой стр. 6 инструкции по применению	Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл		...				отделяемое конъюнктивы	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»	<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²	<i>M. genitalium</i>	1x10 ³ Не применяется ⁴	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ЭДЭМ»	<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²	<i>M. genitalium</i>	1x10 ³ Не применяется ⁴
Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл																				
....	...																							
отделяемое конъюнктивы	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»	<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²																				
			<i>M. genitalium</i>	1x10 ³ Не применяется ⁴																				
	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ЭДЭМ»	<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²																				
			<i>M. genitalium</i>	1x10 ³ Не применяется ⁴																				
3	Раздел «Диагностические характеристики» Стр. 7 и 8 Значения диагностических характеристик (специфичности и чувствительности), с доверительной вероятности 95% в таблицах 3 и 4, а так же в тексте инструкции изменены на значения, полученные в результате клинико-лабораторных испытаний Изменение внести заменой стр. 7 и 8 инструкции по применению																							
4	Раздел «Меры предосторожности» Стр. 8 При работе всегда следует выполнять следующие требования: При работе необходимо всегда выполнять следующие требования Изменение внести заменой стр. 8 инструкции по применению																							
5	Раздел «Меры предосторожности» Стр. 9 Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».																							

ООО «НекстБио» 09286667	2/012-2015	Инструкции по применению набора реагентов для определения ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> и <i>Mycoplasma genitalium</i> методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® СТ/МГ»	
Дата выпуска 21.08.2015		Лист 4	Листов 7

	Изменение ввести заменой стр. 9 инструкции по применению
6	Раздел «Дополнительные материалы и оборудование» Стр. 11 19.Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК. 19.Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК согласно инструкции Производителя.
	Изменение ввести заменой стр. 11 и 12 инструкции по применению
7	Раздел «Взятие, транспортировка и хранение исследуемого материала» Стр. 13-16 <u>В подразделы «Мазки со слизистой оболочки влагалища», «Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры», «Мазки с конъюнктивы» добавлено:</u> В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!
	Изменение ввести заменой стр. 13-16 инструкции по применению
8	Раздел «Взятие, транспортировка и хранение исследуемого материала» Стр. 13 <u>Подраздел «Мазки со слизистой оболочки влагалища»</u> Рабочую часть зонда тампона зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. <u>Стр. 15</u> <u>Подраздел «Моча»</u> У женщин для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер на объемом 50-60 мл. У мужчин — при температуре минус 20 °С — в течение 1 недели; • при температуре минус от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
	Изменение ввести заменой стр. 13-16 инструкции по применению
9	Раздел «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК» Стр. 17 Центрифугировать 5 минут при 10 тыс g (например, 12 об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Центрифугируют 5 минут при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation).
	Изменение ввести заменой стр. 17 инструкции по применению

ООО «НекстБио» 09286667	2/012-2015	Инструкции по применению набора реагентов для определения ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> и <i>Mycoplasma genitalium</i> методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® СТ/МГ»
Дата выпуска 21.08.2015	Лист 5	Листов 7

10

Разделы «Формы комплектации 1, 2, 3»

Подраздел «Амплификация с детекцией по «конечной точке»

Стр. 20

6.Поставить контрольные реакции:

а) положительный контроль ПЦР (K+) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K2 complex.

~~б) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.~~

б) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО (или из транспортной среды ТС-ЭДЭМ, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

Стр. 25

5.Поставить контрольные реакции:

а) положительный контроль ПЦР (K+) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K2 complex.

~~б) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.~~

б) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО (или из транспортной среды ТС-ЭДЭМ, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

Изменение ввести заменой стр. 20-21 и 25-27 инструкции по применению

11

Разделы «Формы комплектации 1, 2, 3»

Подраздел «Амплификация с детекцией по «конечной точке»

Стр. 22

Таблица 7

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE	ROX	
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения	ДНК <i>C. trachomatis</i> и <i>M. genitalium</i> НЕ обнаружена
Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше или ниже порогового значения Не учитывается	ДНК <i>C. trachomatis</i> обнаружена
Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения положительного результата	Выше или ниже порогового значения Не учитывается	ДНК <i>M. genitalium</i> обнаружена
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения	Невалидный*
Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Выше или ниже порогового значения Не учитывается	Сомнительный**

ООО «НекстБио» 09286667	2/012-2015	Инструкции по применению набора реагентов для определения ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> и <i>Mycoplasma genitalium</i> методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® СТ/МГ»
Дата выпуска 21.08.2015	Лист 6	Листов 7

Стр. 27

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE	ROX	
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения	ДНК <i>C. trachomatis</i> и <i>M. genitalium</i> НЕ обнаружена
Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше или ниже порогового значения Не учитывается	ДНК <i>C. trachomatis</i> обнаружена
Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения положительного результата	Выше или ниже порогового значения Не учитывается	ДНК <i>M. genitalium</i> обнаружена
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения	Невалидный*
Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Выше или ниже порогового значения Не учитывается	Сомнительный**

Изменение ввести заменой стр. 22-23 и 27-29 инструкции по применению

12

Разделы «Формы комплектации 1. 2. 3»

Подраздел «Возможные ошибки» добавлено описание действий в случае, если для ОК отсутствует сигнал по каналу для флуорофора ROX.

Стр. 23 и 28

~~2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.~~

2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК):

- сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;
- сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора ROX отсутствует или ниже порогового значения. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

Изменение ввести заменой стр. 23-24 и 28-30 инструкции по применению

ООО «НекстБио» 09286667	2/012-2015	Инструкции по применению набора реагентов для определения ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> и <i>Mycoplasma genitalium</i> методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® СТ/МГ»	
Дата выпуска 21.08.2015		Лист 7	Листов 7

13	Разделы «Формы комплектации 1, 2, 3» <u>Подраздел «Возможные ошибки»</u> <u>Стр. 23 и 28</u> 3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК. ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО. Изменение ввести заменой стр. 23-25 и 28-31 инструкции по применению		
ИЗМЕНЕНИЯ ВНЕС:		(Сорокина М.Ю.)	21.08.2015 г.

Пронумеровано, прошито и скреплено

7 лист (а/ов)

Генеральный директор

Общества с ограниченной

ответственностью «НекстБио»



В. М. Трухан

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
Общества с ограниченной
ответственностью «НекстБио»



В.М. Трухан
2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения ДНК
Chlamydia trachomatis и *Mycoplasma genitalium* методом
полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro

«АмплиПрайм[®] СТ/МГ»

АмплиПрайм[®]



ООО «НекстБио»,
Российская Федерация, 111394,
город Москва, улица Полимерная, дом 8, стр. 2

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	13
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	17
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	18
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	18
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	18
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ 1 и 2 («ПЦР-комплект» вариант FER-100-0,2 или FER-100-0,5)	20
СОСТАВ	20
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	20
А. Подготовка пробирок для амплификации	20
Б. Проведение амплификации.....	22
В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»	22
Г. Интерпретация результатов	23
Возможные ошибки	24
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 3 (комплекты реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FER-100-0,2).....	26
СОСТАВ	26
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	27
А. Подготовка пробирок для амплификации	27
Б. Проведение амплификации.....	28
В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»	28
Г. Интерпретация результатов	29
Возможные ошибки	30
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	32
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	32
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	33
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	34

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеотидтрифосфат
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
НК	- нуклеиновые кислоты
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
FER	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® CT/MG» предназначен для качественного определения ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium* в биологическом материале (отделяемое слизистых оболочек влагалища, цервикального канала, уретры, конъюнктивы; моча, секрет предстательной железы) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на хламидийную инфекцию нижних отделов мочеполового тракта, хламидийный конъюнктивит, цервицит, уретрит и вагинит вызванные *M. genitalium*.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью комплектов реагентов, рекомендованных Производителем.

ВНИМАНИЕ! В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL¹) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора.

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 3 реакции – амплификация участков ДНК *C. trachomatis* и *M. genitalium*, а также амплификация последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК *C. trachomatis* и *M. genitalium*, а также ДНК ВКО-FL регистрируются по 3 различным каналам флуоресцентной детекции:

¹ ВКО-FL входит в состав комплекта реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из каждого исследуемого материала.

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
ДНК-мишень	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК ВКО-FL
Область амплификации	<i>cryptic plasmid</i>	<i>gyrB</i> gene	искусственно синтезированная последовательность

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 (пробирки 0,2 мл).

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,5 (пробирки 0,5 мл).

Форма 3 включает комплекты реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 (пробирки 0,2 мл).

Формы комплектации 1, 2 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Производителем.

Форма комплектации 3 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке», и позволяет выявлять ДНК в качественном формате.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ²
отделяемое слизистых оболочек	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм®	<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²

² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ):

– в биологическом материале (отделяемое слизистых оболочек влагалища, цервикального канала, уретры, конъюнктивы), помещенном в указанную транспортную среду, в пересчете на 1 мл;
– в пересчете на 1 мл образца мочи или секрета предстательной железы.

влагалища, цервикального канала, уретры	ТСМ» или «Транспортная среда ТС- ЭДЭМ» ³	МАГНО-сорб- УРО»	<i>M. genitalium</i>	1x10 ³
	«Транспортная среда ТС- ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ЭДЭМ»	<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²
			<i>M. genitalium</i>	1x10 ³
отделяемое конъюнктивы	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС- ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм МАГНО-сорб- УРО»	<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²
			<i>M. genitalium</i>	Не применяется ⁴
	«Транспортная среда ТС- ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ЭДЭМ»	<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²
			<i>M. genitalium</i>	Не применяется ⁴
моча	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС- ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм МАГНО-сорб- УРО»	<i>C. trachomatis</i>	1x10 ³
			<i>M. genitalium</i>	2x10 ³
	«Транспортная среда ТС- ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ЭДЭМ»	<i>C. trachomatis</i>	1x10 ³
			<i>M. genitalium</i>	2x10 ³
секрет предстательной железы	–	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм МАГНО-сорб- УРО»	<i>C. trachomatis</i>	5x10 ²
			<i>M. genitalium</i>	1x10 ³

Данная чувствительность достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая чувствительность в отношении каждого из микроорганизмов сохраняется и в присутствии высокой концентрации ДНК второго анализируемого микроорганизма – до 10⁹ ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Gardnerella vaginalis*; *Lactobacillus* spp.; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*; *Streptococcus agalactiae*; *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Candida krusei*; *Mycoplasma hominis*; *Ureaplasma urealyticum*; *Ureaplasma parvum*; *Neisseria flava*; *Neisseria subflava*; *Neisseria sicca*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Neisseria mucosa*; *Trichomonas vaginalis*; *Treponema pallidum*; *Toxoplasma gondii*; HSV 1 и 2 типа; CMV; HPV, а также геномной ДНК человека.

³ Форма комплектации 3 или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ».

⁴ Выявление данного микроорганизма в указанном виде биоматериала не имеет клинического значения.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 3

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиПрайм® СТ/МГ» в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиПрайм® СТ/МГ»		Результаты применения референтного метода ⁵			
			<i>C. trachomatis</i>		<i>M. genitalium</i>	
			положительных	отрицательных	положительных	отрицательных
Отделяемое слизистой оболочки влагалища	Всего исследовано 500 образцов	положительных	200	0	210	0
		отрицательных	0	300	0	290
Отделяемое слизистой оболочки цервикального канала	Всего исследовано 545 образцов	положительных	215	0	200	0
		отрицательных	0	330	0	345
Отделяемое слизистой оболочки уретры	Всего исследовано 505 образцов	положительных	212	0	203	0
		отрицательных	0	293	0	302
Отделяемое конъюнктивы	Всего исследовано 340 образцов	положительных	130	0	0	0
		отрицательных	0	210	0	340
Моча	Всего исследовано 530 образцов	положительных	200	0	220	0
		отрицательных	0	330	0	310
Секрет предстательной железы	Всего исследовано 420 образцов	положительных	201	0	205	0
		отрицательных	0	219	0	215

Были использованы 500 образцов отделяемого слизистых оболочек влагалища, 545 образцов отделяемого слизистых оболочек цервикального канала и 505 образцов отделяемого слизистых оболочек уретры, полученных от пациентов, обратившихся к врачу с симптомами урогенитальной инфекции; 340 образцов отделяемого конъюнктивы, полученных от пациентов с ее острым или хроническим воспалением; 530 образца мочи, полученных от мужчин с уретритом; 420 образцов секрета предстательной железы, полученных от пациентов с симптомами урогенитальной инфекции.

⁵ В качестве референтного метода использовались наборы реагентов «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-FL» (ПУ № ФСР 2009/06555) и «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL» (ПУ № ФСР 2007/00580).

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиПрайм® СТ/МГ»**

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ⁶ (с доверительной вероятностью 95 %), не менее %		Диагностическая специфичность ⁷ (с доверительной вероятностью 95 %), не менее %	
	<i>C. trachomatis</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>M. genitalium</i>
отделяемое слизистой оболочки влагалища	98,5	98,6	99,0	99,0
отделяемое слизистой оболочки цервикального канала	98,6	98,5	99,1	99,1
отделяемое слизистой оболочки уретры	98,6	98,6	99,0	99,0
отделяемое конъюнктивы	97,7	-	98,6	99,1
моча	98,5	98,6	99,1	99,0
секрет предстательной железы	98,5	98,5	98,6	98,6

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» 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».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

⁶ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁷ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁸. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия

⁸ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – Safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»):

- При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для формы комплектации, включающей комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»):

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека (для всех форм комплектации):

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком «АмплиПрайм ТСМ» (ПУ № ФСР 2012/14205), «Транспортная среда для мазков «АмплиПрайм ТС» (ПУ № ФСР 2012/14203), «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» (форма комплектации 3

или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ») (РУ № ФСР 2012/14018) или другие рекомендованные Производителем.

2. Зонд гинекологический универсальный (например, ЗГУ «ЦМ», ООО «ЦЕНТРМЕД», Россия или аналогичный).
3. Зонд «Юнона» цитощетка (например, ЗАО «Медицинское предприятие Симург», Республика Беларусь или аналогичная).
4. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).
5. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
6. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

7. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» вариант 50С или вариант 100С (РУ № ФСР 2012/14204), «АмплиПрайм ЭДЭМ» (форма комплектации 1 или 2) (РУ № ФСР 2012/14018) или другие рекомендованные Производителем.
8. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

При использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» совместно с автоматическими станциями для экстракции НК:

9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
10. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или одноразовые 96-луночные планшеты для элюции (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
14. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

15. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 16. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 17. Автоматические дозаторы переменного объема (например, «ООО Биохит», Россия, или аналогичные).
 18. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neop 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) или аналогичная).
 19. Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК согласно инструкции Производителя.
 20. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 21. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 22. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
- При использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» в случае ручной методики экстракции НК:
23. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 24. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
 25. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 26. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 27. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 28. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.
 29. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 30. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 31. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
 32. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия), или аналогичный).
 33. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит»,

Россия, или аналогичные).

34.Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

35.Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

36.Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

37.Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США или аналогичные).

38.Штативы для пробирок объемом 0,5 мл или 0,2 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США или аналогичные).

39.Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

40.Вортекс (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).

41.Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

42.Программируемый амплификатор (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), MaxyGene Gradient (Axygen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк.»), США) и другие рекомендованные Производителем).

43.Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (АЛА-1/4) (SIA BioSan, Латвия), «Джин» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и другие рекомендованные Производителем).

44.Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

45.Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

46.Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- отделяемое слизистой оболочки влагалища (мазки, соскобы),
- отделяемое слизистой оболочки цервикального канала (соскобы эпителия),
- отделяемое слизистой оболочки уретры (соскобы эпителия),
- отделяемое конъюнктивы (мазки, соскобы),
- моча (осадок первой порции утренней мочи),
- секрет предстательной железы.

Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести с помощью зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой из заднебокового свода влагалища.

Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая отделяемое. Материал из влагалища взять в достаточном количестве. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. В случае использования транспортной среды с муколитиком ее цвет может измениться за счет изменения pH (при кислом pH отделяемого).

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

Доступ к цервикальному каналу обеспечить с помощью одноразового или многоразового стерильного гинекологического зеркала. Взятие материала провести с помощью цервикальной цитощетки или универсального зонда в пробирку с транспортной средой. При использовании универсального зонда объем соскобного отделяемого будет меньше. Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном, затем ввести рабочую часть цитощетки/зонда в цервикальный канал и сделать два-три полных оборота по часовой стрелке. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови. Извлечь цитощетку/зонд и поместить рабочую часть, содержащую взятый материал, в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть цитощетки/зонда обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть цитощетки или универсального зонда следует максимально полно смыть биоматериал с их рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней

части крышки, и промаркировать

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

У женщин получение отделяемого уретры проводить с помощью уретрального зонда в пробирку с транспортной средой.

Перед взятием соскоба из уретры необходимо обработать наружное отверстие уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором, чтобы удалить отделяемое из влагалища. Ввести рабочую часть зонда в уретру, несколькими вращательными движениями собрать отделяемое уретры на рабочую часть зонда. Допустимо присутствие примесей в виде слизи и крови. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить в области насечки и оставить в пробирке с транспортной средой. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

У мужчин перед взятием соскоба из уретры обработать головку полового члена в области наружного отверстия уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Провести массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удалить их сухим тампоном. Ввести зонд в уретру на глубину 1–2 см. Несколько вращательными движениями провести соскоб эпителиальных клеток. Допустимо умеренное присутствие примесей в виде слизи, крови и гноя. Зонд перенести в пробирку с транспортной средой, рабочую часть зонда с материалом обломить и оставить в пробирке. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Мазки с конъюнктивы

Материал забирать сухим стерильным ватным тампоном на пластиковой основе под местной анестезией (2 капли раствора декаина). Оттянув нижнее веко, вращающими движениями провести зонд 4-5 раз по конъюнктиве, захватывая внешний и внутренний углы глаза. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) поместить в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, аккуратно обломить пластиковый стержень и оставить рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. В случае невозможности обломить рабочую часть зонда, следует максимально полно смыть биоматериал с рабочей части в пробирку с транспортной средой, прижав ее к внутренней стороне пробирки и вращая по 5–10 раз по часовой и против часовой стрелки.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Моча

У женщин для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер объемом 50-60 мл. Сбор мочи провести после тщательного туалета наружных половых органов. Желательно закладывать тампон во влагалище перед сбором материала для предупреждения контаминации мочи отделяемым из влагалища. Также не следует производить сбор мочи во время менструации.

У мужчин при мочеиспускании необходимо освободить наружное отверстие мочеиспускательного канала, полностью оттянув кожную складку. Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон на 50–60 мл.

Допускается хранение образцов мочи до проведения предобработки:

- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °C – в течение 1 недели;

- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Секрет предстательной железы

Перед получением секрета предстательной железы головку полового члена обработать стерильным ватным тампоном. Секрет простаты забрать после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. После окончания массажа предстательной железы ее секрет в количестве 0,5–1 мл собрать в одноразовую стерильную сухую пластиковую пробирку объемом 2 мл или стерильный сухой контейнер объемом 50–60 мл. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать. При невозможности получить секрет сразу после массажа простаты собрать первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 15–25 мл (см. порядок забора мочи).

Допускается хранение образцов секрета предстательной железы до проведения ПЦР-исследования:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы мазков (соскобов) со слизистых оболочек влагалища, цервикального канала, уретры, конъюнктивы, образцы секрета предстательной железы не требуют предварительной подготовки.

Образцы мочи требуют предварительной подготовки. Флакон с мочой взболтать. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5 минут при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова концентрировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить супернатант, используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра, не захватывая осадок. К осадку добавить транспортную среду, до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов мочи до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Использование для проведения ПЦР-исследования биологического материала, содержащего избыточное количество примесей в виде слизи, крови, гноя и др. может приводить к ингибированию реакции амплификации. Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Не пригодными для исследования являются образцы мочи и секрета предстательной железы, собранные ранее 24 часов от момента доставки в лабораторию.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК,
- флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»,
- интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО», «АмплиПрайм ЭДЭМ» и другие рекомендованные Производителем. Порядок работы с комплектами реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм ЭДЭМ» смотрите в инструкции к используемому комплекту для экстракции, порядок работы с комплектом реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» смотрите в **приложении 1**.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

● Объем ВКО-FL – 10 мкл в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОКО.

Объем элюции – 100 мкл.

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ»:

ВНИМАНИЕ! Добавление ВКО-FL в исследуемые образцы и контроли не требуется.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл транспортной среды ТС-ЭДЭМ.

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ 1 и 2 («ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 или FEP-100-0,5)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 или FEP-100-0,5 для амплификации фрагментов ДНК *C. trachomatis* и *M. genitalium* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-буфер-А-Фон ⁹	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ^{10, 11}	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли и фоновые образцы.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL *C. trachomatis* / *M. genitalium* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте б), а также двух образцов «Фон». Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.

⁹ Реагент используется при исследовании проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов для экстракции «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» и «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО».

¹⁰ Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология»).

¹¹ Реагент входит только в состав «ПЦР-комплекта» вариант FEP-100-0,5.

2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-FL *C. trachomatis* / *M. genitalium*.
3. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.¹²
4. Приготовить образцы «Фон». Для этого в две пробирки с ПЦР-смесью-FL *C. trachomatis* / *M. genitalium* на поверхность застывшего воска внести **20 мкл ПЦР-буфера-А-Фон**. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.¹¹

ВНИМАНИЕ! Реагент **ПЦР-буфер-А-Фон** используется при исследовании проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» и «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО». При использовании других комплектов реагентов для экстракции ДНК, рекомендованных Производителем, необходимо следовать инструкции к используемому набору реагентов.

ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, той же серией комплекта реагентов для экстракции и того же типа ПЦР-пробирок.

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплекта реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

6. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл K2 complex**.
 - б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО** (или из **транспортной среды ТС-ЭДЭМ**, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной

¹² Только при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FEP-100-0,5.

смесью внести 10 мкл К—.

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 5).
2. Запустить выполнение программы амплификации. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), установить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.

Примечание. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

Таблица 5

Программа амплификации

Для амплификаторов группы 1 ¹³				Для амплификаторов группы 2 ¹⁴			Для амплификаторов группы 3 ¹⁵		
Цикл	Темпе- ратура, °С	Время	Кол-во циклов	Темпе- ратура, °С	Время	Кол-во циклов	Темпе- ратура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
5	10	Хранение		10	Хранение		10	Хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по 3 каналам:

Таблица 6

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК BKO-FL

¹³ «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие рекомендованные Производителем.

¹⁴ GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Group of The Applied Biosystems Corporation) и другие рекомендованные Производителем.

¹⁵ MaxyGene Gradient (Axygen Scientific Inc.) и другие рекомендованные Производителем.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. вкладыш, прилагаемый к набору реагентов.)

Г. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам детекции. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Таблица 7

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE	ROX	
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения	ДНК <i>C. trachomatis</i> и <i>M. genitalium</i> НЕ обнаружена
Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Не учитывается	ДНК <i>C. trachomatis</i> обнаружена
Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения положительного результата	Не учитывается	ДНК <i>M. genitalium</i> обнаружена
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения	Невалидный*
Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Не учитывается	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать отрицательным.

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения флуоресцентных сигналов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 8 и пороговыми значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 8

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
OK	Экстракция ДНК	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения
K–	ПЦР	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения
K+	ПЦР	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения

Возможные ошибки

- Для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE ниже порогового значения положительного результата и/или сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора ROX ниже порогового значения. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
- Для отрицательного контроля экстракции (OK):
 - сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;
 - сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора ROX отсутствует или ниже порогового значения. Это означает, что OK не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Для отрицательного контроля ПЦР (K–) сигнал флуоресценции по каналам для

флуорофоров FAM и/или JOE выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 3 (комплекты реагентов «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» и «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2)

СОСТАВ

Комплект реагентов «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» вариант 100С – комплект реагентов для экстракции ДНК из биологического материала – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ¹⁶	50	1 флакон
Компонент А-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	6,0	4 флакона
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,6	2 пробирки
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	13 пробирок
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов вариант 100С рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 для амплификации фрагментов ДНК *C. trachomatis* и *M. genitalium* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>C. trachomatis</i> / <i>M. genitalium</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-буфер-А-Фон	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли и фоновые образцы.

¹⁶ При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 30 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-FL *C. trachomatis* / *M. genitalium* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 6), а также двух образцов «Фон». Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
2. На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-буфера-К, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-FL *C. trachomatis* / *M. genitalium*.
3. Приготовить образцы «Фон». Для этого в две пробирки с ПЦР-смесью-FL *C. trachomatis* / *M. genitalium* на поверхность застывшего воска внести 20 мкл ПЦР-буфера-А-Фон.

ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С и использовать многократно. Многократное использование пробирок «Фон» допускается при условии их использования с набором реагентов той же серии, той же серией комплекта реагентов для экстракции и того же типа ПЦР-пробирок.

4. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

5. Поставить контрольные реакции:

- а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K2 complex.
- б) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО (или из транспортной среды ТС-ЭДЭМ, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»).

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной

смесью внести 10 мкл К–.

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 9).
2. Запустить выполнение программы амплификации. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), установить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.

Примечание. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

Таблица 9

Программа амплификации

	Для амплификаторов группы 1 ¹⁷			Для амплификаторов группы 2 ¹⁸			Для амплификаторов группы 3 ¹⁹		
Цикл	Темпе- ратура, °C	Время	Кол-во циклов	Темпе- ратура, °C	Время	Кол-во циклов	Темпе- ратура, °C	Время	Кол-во циклов
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
5	10	Хранение		10	Хранение		10	Хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по 3 каналам:

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК ВКО-FL

¹⁷ «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие рекомендованные Производителем.

¹⁸ GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Group of The Applied Biosystems Corporation) и другие рекомендованные Производителем.

¹⁹ MaxyGene Gradient (Axygen Scientific Inc.) и другие рекомендованные Производителем.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. вкладыш, прилагаемый к набору реагентов.)

Г. Интерпретация результатов

Результаты интерпретируются на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам детекции. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE	ROX	
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения	ДНК <i>C. trachomatis</i> и <i>M. genitalium</i> НЕ обнаружена
Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Не учитывается	ДНК <i>C. trachomatis</i> обнаружена
Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения положительного результата	Не учитывается	ДНК <i>M. genitalium</i> обнаружена
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения	Невалидный*
Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Не учитывается	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать отрицательным.

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения флуоресцентных сигналов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 12 и пороговыми значениями, указанными во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция ДНК	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения
K–	ПЦР	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения
K+	ПЦР	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения

Возможные ошибки

- Для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE ниже порогового значения положительного результата и/или сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора ROX ниже порогового значения. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
- Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК;
 - сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора ROX отсутствует или ниже порогового значения. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля контаминации. Требуется повторное ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Для отрицательного контроля ПЦР (K–) сигнал флуоресценции по каналам для

флуорофоров FAM и/или JOE выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и/или ВКО.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут. Комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО», «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 и вариант FEP-100-0,5 при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» хранить при температуре от 2 до 25 °С, кроме ВКО-FL. ВКО-FL хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,2 и «ПЦР-комплект» вариант FEP-100-0,5 хранить при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-К. ПЦР-буфер-К хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *C. trachomatis* / *M. genitalium* хранить в защищенном от света месте.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиПрайм® СТ/МГ» направлять в адрес предприятия-производителя ООО «НекстБио» (111394 г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр.2) в отдел по работе с рекламациями (тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Согласовано:

Научный руководитель испытательной лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
д.м.н., профессор



В. В. Долгов

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Максимальное
число тестов



Код партии



Использовать до



Изделие для in vitro
диагностики



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Дата изменения



Не допускать
попадания
солнечного света



Ограничение
температуры



Дата изготовления



Производитель



Беречь от влаги



Хрупкое. Осторожно



Верх

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция ДНК из исследуемых образцов с использованием комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»

ВНИМАНИЕ! При использовании автоматической станции для экстракции детальная информация по процедуре экстракции ДНК из биологических образцов изложена в инструкции по использованию автоматической станции.

Порядок работы

ВНИМАНИЕ! Лизирующий раствор МАГНО-сорб имеет неприятный запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

1. Прогреть лизирующий раствор МАГНО-сорб при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции, если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования). Промаркировать.
3. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл ВКО-FL, компонент А-1 и магнетизированную силику из расчета на один образец: 10 мкл ВКО-FL, 10 мкл компонента А-1 и 10 мкл магнетизированной силики.²⁰ При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на один образец больше, например:

Количество образцов для экстракции ДНК	ВКО-FL, мкл	Компонент А-1, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	70
12	130	130	130
18	190	190	190
24	250	250	250

4. Внести в пробирки объемом 1,5 мл по 30 мкл подготовленной смеси ВКО-FL, компонента А-1 и магнетизированной силики.
5. Добавить в пробирки по 450 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб.
6. Внести в подготовленные пробирки по 100 мкл исследуемых образцов.
7. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести 100 мкл ОКО.
8. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
9. Осадить капли на вортексе и перенести пробирки в магнитный штатив на 2 мин.
10. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.

²⁰ Предварительное смешивание ВКО-FL, компонента А-1 и магнетизированной силики позволяет упростить процедуру экстракции. Возможно раздельное внесение этих реагентов.

11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 7**, плотно закрыть крышки.
12. Смыть магнетизированную силику перемешиванием на вортексе, затем осадить капли на вортексе.
13. Переставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив на **1 мин.**
14. Отобрать надосадочную жидкость, аналогично п. 10. Перенести пробирки в обычный штатив.
15. Высушить магнетизированную силику, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин.**
16. Добавить в пробирки по **100 мкл буфера для элюции В**, перемешать на вортексе.
17. Поместить пробирки в термостат с температурой **60 °С** на **5 мин.**
18. Осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив на **2 мин.** Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенных ДНК для проведения ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для этого необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
21.08.2015	По тексту	Исправлены опечатки
	Принцип метода	Уточнена фраза об инаktivации УДГ
	Меры предосторожности	Формулировки «всегда следует» и «следует рассматривать» заменены на «необходимо всегда» и «рассматривать»
		Дополнены сведения об описании утилизации или уничтожения упаковки, биологического материала, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом с отдельным описанием правил
	Дополнительные материалы и оборудование	Уточнено, что комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК должен соответствовать инструкции Производителя
	Взятие, транспортировка и хранение исследуемого материала	Добавлено описание действий в случае невозможности обломить рабочую часть зонда. Исправлены стилистические ошибки
	Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК	Формулировка «12 об/мин» заменена на «12 тыс об/мин»
	Формы комплектации 1, 2, 3 «Амплификация с детекцией по «конечной точке»	Добавлено описание постановки отрицательного контроля в случае, если экстракция проводилась с помощью «АмплиПрайм ЭДЭМ»
		В таблицах 7 и 11 формулировка « <u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения» заменена на «Не учитывается»
	Формы комплектации 1, 2, 3 «Возможные ошибки»	Добавлено описание действий в случае, если для ОК отсутствует сигнал по каналу для флуорофора ROX. Исправлены стилистические ошибки
	Диагностические характеристики	Изменены значения диагностических характеристик (специфичности и чувствительности) на значения, полученные в результате клинико-лабораторных испытаний, с доверительной вероятности 95%
	Аналитические характеристики	Изменены значения аналитической чувствительности для микроорганизма <i>M. Genitalium</i> в образцах отделяемого конъюнктивы.

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 36 ЛИСТОВ
« 15 СЕН 2015 » 201__ год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕНТР»

Ю.Н. Егоров

