

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Лабцентр АГ»



Д.А. Стуканов

ноября 2022 г.

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### Набор реагентов

для качественного выявления ДНК микроорганизмов класса *Mollicutes* в  
биологическом материале человека методом ПЦР  
(*Mollicutes*)

ТУ 21.20.23-001-01897475-2022

Москва – 2022 г.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

|     |                                     |
|-----|-------------------------------------|
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция       |
| ЛКО | - лабораторный контрольный образец  |
| ИВ  | - интерферирующие вещества          |
| ДНК | - дезоксирибонуклеиновая кислота    |
| ВК  | - внутренний контроль               |
| К+  | - положительный контрольный образец |
| К-  | - отрицательный контрольный образец |

### Введение

Настоящая Инструкция распространяется на «Набор реагентов для качественного выявления ДНК микроорганизмов класса Mollicutes в биологическом материале человека методом ПЦР (Mollicutes) по ТУ 21.20.23-001-01897475-2022», далее по тексту набор реагентов, Mollicutes.

Класс микроорганизмов Mollicutes (от лат. mollis – мягкий и cutis – кожа) выделенных в отдельную таксономическую группу отличается от бактерий отсутствием жесткой клеточной стенки. К молликутам кроме собственно рода Mycoplasma относят представители рода: Ureaplasma.

Молликуты являются внутриклеточными патогенами и часто контаминируют культуры клеток. Патогенными и потенциально патогенными для человека считаются виды: Mycoplasma pneumoniae, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma penetrans, Mycoplasma genitalium,

Клиническое значение имеют следующие виды: Mycoplasma pneumoniae – является одним из основных возбудителей внебольничной пневмонии, бронхита и другие респираторных заболеваний. Mycoplasma penetrans ассоциируют с саркомой Капоши и реализацией СПИДа у ВИЧ-инфицированных. Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma genitalium и Mycoplasma fermentans - урогенитальные микоплазмы, ответственны за развитие негонорейного уретрита, эпидидимита, воспалительных заболеваний органов малого таза, патологий беременности и плода и некоторые случаи бесплодия.

Применение набора реагентов для выявления ДНК микроорганизмов класса Mollicutes позволяет провести исследование на спектр возбудителей класса Mollicutes, своевременно их выявить и назначить лечение, в том числе с использованием специфических препаратов. Изделие может использоваться для контроля успешности лечения путем повторных исследований. Отрицательный результат позволяет исключить заболевания, вызванные молликутами при проведении дифференциальной диагностики заболеваний. Также набора реагентов может быть использован для выявления возбудителей класса Mollicutes при контроле качества биомедицинских клеточных продуктов.

## 1. ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

1.1 **Полное наименование набора реагентов:** «Набор реагентов для качественного выявления ДНК микроорганизмов класса *Mollicutes* в биологическом материале человека методом ПЦР (Mollicutes) по ТУ 21.20.23-001-01897475-2022»

1.2 **Назначение:** Набор реагентов предназначен для качественного выявления ДНК класса *Mollicutes* в биологическом материале человека (соскоб из уrogenитального тракта, мазок из носоглотки, культура клеток человека) и образцах бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала на плотную или жидкую питательную среду, методом ПЦР в режиме реального времени. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

1.3 **Функциональное назначение:** изделие предназначено для диагностика *in vitro* (для качественного выявления ДНК микроорганизмов класса *Mollicutes* методом ПЦР в биологическом материале человека)

1.4 **Показания к проведению исследования:** симптомы инфекционного заболевания уrogenитального и респираторного трактов.

1.5 **Противопоказания к применению:** противопоказаний к применению нет.

1.6 **Популяционные и демографические аспекты:** применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.7 **Область применения:** набор реагентов может быть использован в медицинских учреждениях для клинической лабораторной диагностики и при контроле качества биомедицинских клеточных продуктов.

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

1.9 **Применять** набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

1.10 **Побочные действия:** не применимо для данного медицинского изделия

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

## 2.1. Состав набора реагентов

| Наименование компонентов                       | Внешний вид                                                  | Количество пробирок | Номинальный объем компонента |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Набор реагентов                                | 1 шт.                                                        |                     |                              |
| Смесь для амплификации, запечатанная парафином | Прозрачная бесцветная жидкость под воскообразным белым слоем | 96 пробирок         | по 20 мкл                    |
| Раствор Taq-полимеразы                         | Прозрачная бесцветная жидкость                               | 2 пробирки          | по 500 мкл                   |
| Минеральное масло                              | Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость            | 2 пробирки          | по 1,0 мл                    |
| Положительный контрольный образец (К+)         | Прозрачная бесцветная жидкость                               | 1 пробирка          | 130 мкл                      |
| Инструкций по применению                       | 1 шт.                                                        |                     |                              |
| Паспорт                                        | 1 шт.                                                        |                     |                              |

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

## 2.2. Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для однократного применения и рассчитан на 96 определений (включая контрольные образцы), что соответствует исследованию не более 94 неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

## 2.3. Принцип метода

**Метод:** Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией результатов «в режиме реального времени»; качественный анализ.

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

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта. «Горячий» старт обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина. Помимо этого, парафин обеспечивает запечатывание реакционной смеси и дополнительную защиту от контаминации ампликонами.

В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфического продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается,

что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации.

В состав смеси для амплификации включен внутренний контроль (ВК), который предназначен для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции.

Т а б л и ц а 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| Fam                     | Hex |
| Класс <i>Mollicutes</i> | ВК  |

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

2.4. **Время проведения анализа** (исключая пробоподготовку): от 1,5 часов.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

#### 3.1. Специфичность анализа

В образцах биологического материала человека, содержащих микроорганизмов класса *Mollicutes*, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует положительный результат амплификации специфического продукта по каналу детекции Fam.

В образцах биологического материала, не содержащих микроорганизмов класса *Mollicutes*, при проведении амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора фиксирует отрицательные результаты амплификации специфического продукта и положительный результат амплификации внутреннего контроля (ВК).

Аналитическая специфичность набора реagens подтверждена с использованием генно-инженерных конструкций (рекомбинантных плазмид) соответствующих последовательностям ДНК выявляемых консенсусных последовательностей 16S РНК родов класса *Mollicutes*.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при исследовании в высокой концентрации ДНК микроорганизмов, потенциально присутствующих в исследуемых образцах: *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, а также ДНК человека в концентрации до  $1,0 \times 10^8$  копий/мл образца.

#### 3.2. Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком ингибирования ПЦР

является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта.

К ингибиторам ПЦР, источником которых может являться образец ДНК, отнесены следующие вещества: лекарственные препараты, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления в ходе выделения ДНК из образца биоматериала, а также изопропиловый спирт и метилацетат, присутствующие в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

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

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

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

### 3.3. Предел обнаружения:

Предел обнаружения составляет не менее 5 копий ДНК каждого микроорганизма на амплификационную пробирку. Предел обнаружения установлен путём анализа серийных разведений лабораторного контрольного образца (ЛКО). Для каждой концентрации было проведено 40 определений:

| Копий ДНК-мишени в ЛКО /на амплификационную пробирку | Количество повторов | Количество положительных результатов | % положительных результатов |
|------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 5,0                                                  | 40                  | 40                                   | 100                         |
| 2,5                                                  | 40                  | 27                                   | 67,5                        |

### 3.4. Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Внутрисерийная воспроизводимость – 100% (86,28-100%)

Межсерийная воспроизводимость – 100% (86,28-100%)

### 3.5. Диагностические характеристики

Диагностическая чувствительность составляет (95% ДИ): 100% (96,41-100%)

Диагностическая специфичность составляет (95% ДИ): 100% (97,0-100%)

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил и норм СанПиН 3.3686-2021 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СанПиН 3.3686-2021 и определяется видом возбудителя, диагностическим методом, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных правилами и нормами СанПиН 3.3686-2021.

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

При использовании набора реагентов в клинично-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-2021 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

#### Опасные компоненты в наборе реагентов

| Компонент комплекта                            | Опасный компонент   | Указание на риски                              |
|------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------|
| Смесь для амплификации, запечатанная парафином | Нет опасных веществ | -                                              |
| Раствор Taq-полимеразы                         |                     |                                                |
| Минеральное масло                              |                     |                                                |
| Положительный контрольный образец              | Азид натрия <0,1%   | является безопасным для конечного пользователя |

При использовании по назначению и соблюдению мер предосторожности, контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц, аллергическая реакция. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности.

**Примечание** – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование, реагенты и расходные материалы:

- амплификатор детектирующий ДТпрайм
- микроцентрифуга-вортекс
- холодильник или холодильная камера
- морозильная камера
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объём жидкости от 0,5 до 10 мкл, от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 10 мкл
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл
- одноразовые наконечники для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 200 мкл, 1000 мкл
- пробирки объёмом 0,5 мл
- пробирки амплификационные объёмом 0,2 мл
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов
- вода деионизованная
- дезинфицирующее средство

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

### 6.1. Материал для исследования

Для исследования используют пробы ДНК из биологического материала человека:

- соскобы из уrogenитального тракта,
- мазки из носоглотки,
- культуры клеток человека,
- образцы бактериальных культур, полученных путем посева биологического

материала на плотную или жидкую питательную среду.

### 6.2. Общие требования

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала человека необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса. Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию принимает лечащий врач на основании собранного анамнеза и клинической картины заболевания.

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

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

**Примечание** – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 и СанПиН 3.3686-2021.

### 6.3. Взятие материала на исследование

#### 6.3.1. Соскобы из уrogenитального тракта

Взятие материала осуществляется с помощью специальных стерильных одноразовых зондов, согласно установленной процедуре.

**Ограничение метода** – местное применение лекарственных препаратов, УЗИ вагинальным датчиком менее чем за 24 часа до исследования.

После взятия биологического материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований, и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания.

Извлеките зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

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

**Примечание** – Перед получением соскоба эпителиальных клеток из уретры, с заднего свода влагалища и цервикального канала, свободно стекающее отделяемое необходимо удалить стерильным ватным тампоном.

#### 6.3.2. Мазок из носоглотки

Мазки берут сухим стерильным зондом, для чего зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают к низу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. После взятия биологического материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания. Затем извлеките зонд из раствора и, вращательным движением, прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте. Плотнo закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

**Ограничение метода** – местное применение лекарственных препаратов (спреи, капли, кремы и мази) – менее чем за 24 часа до исследования. При использовании аэрозолей и других форм лекарственных препаратов для ингаляций при лечении бронхиальной астмы, материал для исследований следует брать не ранее чем через три часа после ингаляции или приёма пищи.

#### 6.3.3. Культуры клеток человека

Материал забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с поврежденным местом участка. Кусочки ткани диаметром не более 5 мм помещают в одноразовые стерильные пробирки объемом 2 мл, содержащие соответствующую транспортную среду. Пробирку плотно закрывают.

Необходимо поместить 1 мл культуральной среды после культивирования клеток в одноразовую пробирку объёмом 1,5 мл. Центрифугировать пробирку 15 минут при 10000 x g. Удалить супернатант и ресуспендировать осадок в 100 мкл транспортной среды.

#### 6.3.4. Образцы бактериальных культур

Взятие материала с жидких и плотных сред осуществляется при помощи одноразовой микробиологической петли или шпателя. Поместите в одноразовую пробирку объёмом 1,5 мл, в которую предварительно внесено 400 мкл лизирующего раствора, от 5,0 мкл одиночной колонии клеток или до 50 мкл жидкой среды.

**Примечание** – Взятие материала (одиночная колония клеток или 100 мкл жидкой среды) при необходимости производится в одноразовую пластиковую пробирку объемом 1,5-2,0 мл, в которую предварительно внесено 500 мкл стерильного физиологического раствора.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

#### **6.4. Транспортирование и хранение исследуемых образцов**

Условия транспортирования и хранения исследуемого материала в соответствии с инструкцией к Набору реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА-ОПТИМА) (РУ № РЗН 2022/17496, ООО «ДНК-Технология ТС»).

#### **6.5. Подготовка биологического материала человека для исследования**

Подготовка биологического материала в соответствии с инструкцией к Набору реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА-ОПТИМА) (РУ № РЗН 2022/17496, ООО «ДНК-Технология ТС»).

### **7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

#### **7.1. Выделение ДНК из биологического материала**

Для выделения ДНК рекомендуется использовать Набор реагентов для выделения ДНК человека, бактерий, вирусов и грибов из биологического материала человека и культур микроорганизмов (ПРОБА-ОПТИМА) (РУ № РЗН 2022/17496, ООО «ДНК-Технология ТС»).

Выделение ДНК из исследуемого материала проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору/комплекту реагентов.

**ВНИМАНИЕ!** Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот в объеме, указанном в инструкции к соответствующему набору/комплекту реагентов.

#### **7.2. Подготовка и проведение ПЦР**

**ВНИМАНИЕ!** При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.2.1.1. Промаркируйте необходимое количество пробирок/стрипованных пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для исследуемых образцов, для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-».

Пример: необходимо проанализировать 4 образца. Для этого необходимо промаркировать 4 пробирки для исследуемых образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.

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

7.2.1.3. Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.

7.2.1.4. Добавьте в каждую пробирку по одной капле минерального масла (около 20 мкл). Закройте пробирки/стрипы.

7.2.1.5. Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом и отрицательным контрольным образцом в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

#### ВНИМАНИЕ!

Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.1.6. Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-» и «К+», ДНК не вносится.

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

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

7.2.1.9. Центрифугируйте все пробирки/стрипы в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.1.10. Установите все пробирки/стрипы в блок амплификатора. Запустите программное обеспечение RealTime\_PCR в режиме «Работа с прибором». Укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР.

При выборе теста в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора «ДТпрайм»

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

√- режим оптических измерений

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1. **Регистрация сигнала флуоресценции** проводится прибором автоматически во время амплификации.

8.2. **Детекция и учёт результатов** осуществляются детектирующим амплификатором автоматически.

8.3. **После окончания программы амплификации** на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов. На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла по всем используемым каналам для каждой пробирки в термоблоке.

## 9. УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. **Учёт результатов реакции** осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2. **После завершения ПЦР** программа отображает в таблице в графе «Результаты»: индикаторный цикл (Cp) и результат по каждому исследованию (качественный анализ).

9.3. **Интерпретация результатов** проводится в соответствии с таблицей 4. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 4 – Интерпретация результатов ПЦР

| Канал детекции        |     | Результат | Интерпретация результата |
|-----------------------|-----|-----------|--------------------------|
| Fam                   | Hex |           |                          |
| Анализируемые образцы |     |           |                          |

|                                          |                |    |                                                          |
|------------------------------------------|----------------|----|----------------------------------------------------------|
| Ср указан                                | Не учитывается | +  | Обнаружена ДНК микроорганизмов класса Mollicutes         |
| Ср не указан                             | Ср указан      | -  | Не обнаружена ДНК микроорганизмов класса Mollicutes      |
| Ср не указан)                            | Ср не указан   | нд | Недостовверный результат                                 |
| <b>Положительный контрольный образец</b> |                |    |                                                          |
| Ср указан                                | Ср указан      | +  | Положительный результат<br>Результаты постановки валидны |
| <b>Отрицательный контрольный образец</b> |                |    |                                                          |
| Ср не указан                             | Ср указан      | -  | Отрицательный результат<br>Результаты постановки валидны |

9.4. **Недостовверный результат** может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического материала; неверным выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

9.5. Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены результаты, приведенные в таблице 4.

9.6. При получении для положительного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.7. При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице, результаты всей постановочной серии считают недостовверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

## 10. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

### 10.1. Транспортирование

10.1.1. Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

10.1.2. Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри контейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.3. Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима,

применению не подлежат

## 10.2. Хранение

10.2.1. Компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

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

10.2.3. Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, а также с истекшим сроком годности, применению не подлежат.

## 10.3. Указания по эксплуатации

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

10.3.2. Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3. После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

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

## 11. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1. При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09..

11.2. Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

## 12. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

12.2 **Срок годности набора реагентов** – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

## 13. РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для однократного использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

## 14. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

|                                                                                     |                                                     |                                                                                     |                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|    | Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i> |    | Обратитесь к инструкции по применению     |
|  | Предел температуры                                  |  | Номер по каталогу                         |
|  | Содержимого достаточно для проведения n тестов      |  | Изготовитель                              |
|  | Использовать до                                     |  | Не допускать воздействия солнечного света |
|  | Код партии                                          |  | Нестерильно                               |
|  | Дата изготовления                                   |  | Запрет на повторное применение            |

## ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

|                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ГОСТ Р 1.3-2018                               | Технические условия на продукцию. Общие требования к содержанию, оформлению, обозначению и обновлению.                                                                                                                                                                                                                                                    |
| ГОСТ 2.105-2019                               | ЕСКД Общие требования к текстовым документам                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| ГОСТ 15.309-98                                | Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения                                                                                                                                                                                                                                  |
| ГОСТ Р 15.013-2016                            | Система разработки и постановки продукции на производство. Медицинские изделия                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| ГОСТ Р 51088-2013                             | Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, комплекты реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации                                                                                                                                                                  |
| ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015                       | Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.                                                                                                                                                                                                   |
| ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015                       | Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения                                                                                                                                                                         |
| ГОСТ Р 51352-2013                             | Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| ГОСТ Р ИСО 23640-2015                         | Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro                                                                                                                                                                                                                                                      |
| ГОСТ Р 52905-2007<br>(ИСО 15190:2003)         | Лаборатории медицинские. Требования безопасности                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020                       | Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.                                                                                                                                                                                             |
| ГОСТ ISO 14971-2021                           | Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| СанПиН 2.1.3684-21                            | Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий |
| СанПиН 3.3686-21                              | Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| МУ 1.3.2569-09                                | Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности                                                                                                                                                                                           |
| Приказ Минздрава России<br>от 06.06.2012 № 4н | Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий.                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

## АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

По вопросам качества набора реагентов обращаться по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «Лабцентр АГ», ООО «Лабцентр АГ», Россия.

117198, г.Москва, вн.тер.г. муниципальный округ Обручевский, ул. Академика Опарина, д. 4

E-mail: 89161611445@mail.ru

Пронумеровано, прошито и  
скреплено печатью на 20

листах

