

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор ООО НПО «Литех»

А.Ю.Наумов

2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для выявления и идентификации *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae*
методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени
ДИПЛЕКС Ct+Ng для диагностики *in vitro*»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Ng** предназначен для одновременного выявления и идентификации ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией и возможностью количественной оценки результатов анализа в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, секрет предстательной железы, осадок мочи, отделяемое конъюнктивы, отделяемое слизистой ротоглотки).

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Ng** может быть использован в клинической лабораторной диагностике для выявления носительства возбудителей ИППП *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae*, а также для оценки эффективности терапии хламидийной и гонококковой инфекции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Состав набора.

Набор **ДИПЛЕКС Ct+Ng** выпускается в 5 вариантах исполнения.

Варианты исполнения набора различаются степенью готовности реагентов к проведению анализа (нераскапанный, OneStep, TwoStep) (табл. 1).

Таблица 1

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	ДИПЛЕКС Ct+Ng-PB-120	1. Реакционная смесь PB 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 50 мкл 2 пробирки – по 2 мл 1 пробирка – 200 мкл
2	ДИПЛЕКС Ct+Ng-OneStep-PB-60	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	60 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл
3	ДИПЛЕКС Ct+Ng-OneStep-PB-96	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	96 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл
4	ДИПЛЕКС Ct+Ng-TwoStep-PB-60	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	60 пробирок по 21 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 500 мкл
5	ДИПЛЕКС Ct+Ng-TwoStep-PB-96	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	96 пробирок по 21 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 800 мкл

Набор рассчитан на проведение анализа 60, 96 или 120 образцов, включая контрольные образцы, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты.

В состав реакционной (амплификационной) смеси входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфических праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (3 зонда): зонд для специфического фрагмента одного возбудителя содержит флуорофор FAM, зонд для специфического фрагмента второго возбудителя содержит флуорофор ROX, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX.
- праймеры для выявления внутреннего контроля (геномная ДНК человека); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения ДНК.

Амплификационная смесь комплектаций **OneStep** полностью готова к амплификации, содержит Taq-полимеразу;

Реакционная смесь комплектаций **TwoStep** требует внесения Taq-полимеразы, входящей в состав комплекта.

ПКО ИППП представляет собой количественно охарактеризованную смесь 12 плазмид со встроенной вставку специфических фрагментов геномов возбудителей ИППП (*C.trachomatis*, *T.vaginalis*, *N.gonorrhoeae*, *M.genitalium*, *U.parvum*, *U.urealyticum*, *M.hominis*, *Ureaplasma spp.*, *HSV type 1*, *HSV type 2 CMV*) и человека в диапазоне $5 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^4$ ГЭ/мл. Во вкладыше к каждой серии набора реагентов указана точная концентрация плазмид в образце ПКО ИППП, а также диапазон допустимых значений циклов пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (Ct) для ПКО ИППП на различных типах амплификаторов.

2.2. Принцип метода.

Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Ng** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae* путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 2 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК).
2. Проведение ПЦР-амплификации с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе.

Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце.

При количественной оценке значение Ct (цикл пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией) исследуемого образца сравнивается со значением Ct ПКО (положительного

контрольного образца) с известной концентрацией. Концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* и – при необходимости – ДНК человека в образце вычисляется по формуле:

$$C_{\text{Образца}} = C_{\text{ПКО}} * 2^{(Ct_{\text{ПКО}} - Ct_{\text{Образца}})}$$

$C_{\text{Образца}}$ – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце, выраженная в геном-эквивалентах/мл,

$C_{\text{ПКО}}$ – концентрация плазмиды, несущей специфический фрагмент ДНК соответствующего возбудителя (или человека), в ПКО, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору),

$Ct_{\text{Образца}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$Ct_{\text{ПКО}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции положительного контрольного образца с пороговой линией;

Концентрация ДНК возбудителя может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. При этом концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК Chl.tr.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000$$

концентрация ДНК *Neisseria gonorrhoeae* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК N.gon.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000$$

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК Chl.tr.}}$ – вычисленная концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* в образце

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК N.gon.}}$ – вычисленная концентрация ДНК *Neisseria gonorrhoeae* в образце

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}$ – вычисленная концентрация ДНК человека в образце

Количественная оценка необходима для мониторинга и корректировки лечения, а также для учёта погрешностей, связанных с забором материала.

2.3. Ограничения метода.

1) Метод ПЦР позволяет определять ДНК как в живых, так и в мертвых микроорганизмах. Поэтому ПЦР анализ клинических образцов следует проводить до начала антибиотикотерапии; в случае приема антибиотиков анализ проводится не раньше четырех - пяти недель после завершения курса лечения для определения эффективности терапии.

2) При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с ДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции, а также занижение реального содержания ДНК возбудителя в клиническом образце.

3) Вследствие того, что содержание криптолической плазмиды в клетке *Chlamydia trachomatis*, может варьировать от 4 до 9, количественная оценка наличия плазмидной ДНК не может полностью коррелировать с содержанием данного возбудителя в клиническом образце. По этой причине предлагаемый метод определения концентрации позволяет получить лишь оценочное представление о содержании *Chlamydia trachomatis* в клиническом образце.

4) Вследствие того, что содержание криптолической плазмиды в клетке *Neisseria gonorrhoeae* может превышать 30 копий, количественная оценка наличия плазмидной ДНК не может полностью коррелировать с содержанием данного возбудителя в клиническом образце. По этой причине предлагаемый метод определения концентрации позволяет получить лишь оценочное представление о содержании *Neisseria gonorrhoeae* в клиническом образце.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана производителем при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *HSV 1* и *2*, *CMV*, *HPV* (типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), а также геномной ДНК человека. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были. Специфичность, рассчитанная как частота ложноположительных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

3.2. Аналитическая чувствительность

С помощью набора ДИПЛЕКС Ct+Ng можно обнаружить:

- $5 \cdot 10^2$ и более геном-эквивалентов/мл *Chlamydia trachomatis* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе;
- $5 \cdot 10^2$ и более геном-эквивалентов/мл *Neisseria gonorrhoeae* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе.

Ген-мишень для *Chlamydia trachomatis* находится на криптической плазмиде, копияность которой варьирует от 4 до 9, за 1 геном-эквивалент производителем набора реагентов принято значение 5.

Ген-мишень для *Neisseria gonorrhoeae* находится на криптической плазмиде, копияность которой составляет около 30 копий на 1 клетку, за 1 геном-эквивалент производителем набора реагентов принято значение 30.

3.3. Тест на прецизионность

Тест на прецизионность характеризуется рассеянием значений измеренных концентраций, получаемых при использовании набора относительно величины средней концентрации. Для образцов с концентрацией 10^5 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis* и 10^5 геном-эквивалентов/мл для *Neisseria gonorrhoeae* коэффициент вариации составляет не более 10%.

3.4. Тест на правильность определения концентрации

Тест на правильность определения – при детекции образцов с концентрациями 10^7 , 10^5 и 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Neisseria gonorrhoeae* и 10^7 , 10^5 и 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis* процент отклонения измеренной концентрации от значения, принимаемого за истинное, находится в диапазоне 90-110%.

3.5. Диапазон линейности

Диапазон линейности – это диапазон концентраций, при детекции которых зависимость между значениями Ct и log концентрации удовлетворяет линейной модели. Модуль коэффициента корреляции для образцов с концентрациями 10^7 , 10^5 и 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Neisseria gonorrhoeae* и 10^7 , 10^5 и 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis* составляет не менее 0,99. Таким образом, диапазон линейности составляет от 10^7 до 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Neisseria gonorrhoeae* и от 10^7 до 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis*.

4. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Для определения диагностической чувствительности и специфичности были проанализированы 360 образцов отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, 151 образец отделяемого конъюнктивы, 112 образцов отделяемого ротоглотки, 280 образцов осадка

мочи и 172 образца секрета предстательной железы, полученных от пациентов с подозрением на урогенитальную инфекцию, с вагинитом, цервицитом, уретритом, конъюнктивитом, простатитом.

4.1. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определялась как доля, выраженная в %, истинно положительных результатов ко всем получившимся положительными, включая ложноотрицательные, и составила 100%. Для расчета нижней границы интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью $C = 90\%$ использовалась следующая формула:

$$(1-C/100)^{1/n} * 100\%, \text{ где:}$$

n – общее число исследуемых проб с истинно положительными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

C – доверительная вероятность, в данном исследовании принята равной 90%. Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 90% составила:

Таблица 2

Возбудитель	Клинический материал	Число образцов с истинно положительным и результатами	Результаты набора ДИПЛЕКС Ct+Ng		Диагностическая чувствительность
			Положительные	Отрицательные	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	122	122	0	98,13-100%
	Отделяемое конъюнктивы	58	58	0	96,11-100%
	Осадок мочи	136	136	0	98,32-100%
	Секрет предстательной железы	69	69	0	96,72-100%
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	61	61	0	96,30-100%
	Отделяемое конъюнктивы	15	15	0	85,77-100%
	Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	12	12	0	82,54-100%
	Осадок мочи	43	43	0	94,79-100%
	Секрет предстательной железы	30	30	0	92,61-100%

4.2. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определялась как доля, выраженная в %, истинно отрицательных ко всем получившимся отрицательными, включая ложноположительные, и составила 100%. Для расчета нижней границы интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической специфичности с доверительной вероятностью $C = 90\%$ использовалась следующая формула:

$$(1-C/100)^{1/n} * 100\%, \text{ где:}$$

n – общее число исследуемых проб с истинно положительными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

C – доверительная вероятность, в данном исследовании принята равной 90%. Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 90% составила:

Таблица 3

Возбудитель	Клинический материал	Число образцов с истинно отрицательными результатами	Результаты набора ДИПЛЕКС Ct+Ng		Диагностическая специфичность
			Положительные	Отрицательные	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	238	0	238	99,04-100%
	Отделяемое конъюнктивы	93	0	93	97,55-100%
	Осадок мочи	144	0	144	98,41-100%
	Секрет предстательной железы	103	0	103	97,79-100%
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	299	0	299	99,23-100%
	Отделяемое конъюнктивы	136	0	136	98,32-100%
	Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	100	0	100	97,72-100%
	Осадок мочи	237	0	237	99,03-100%
	Секрет предстательной железы	142	0	142	98,39-100%

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б.

5.2. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических 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».

5.3. При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует 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 реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп

патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для всех вариантов исполнения набора

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5 - 50 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 10 и 100 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

Для комплектаций Нераскапанный РВ дополнительно:

- **бесцветные** одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации.
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 200 и до 1000 мкл;

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

7.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Материал для исследования.

Соскоб из уретры или цервикального канала, секрет предстательной железы, осадок мочи. Для определения ДНК *C.trachomatis* используют также соскоб с конъюнктивы глаз.

Взятие материала осуществляется одноразовым стерильным зондом.

За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры. В связи с тем, что хламидия трахоматис является внутриклеточным паразитом и размножается только внутри клеток цилиндрического эпителия уретры или цервикального канала для получения адекватного результата необходимо, чтобы исследуемый материал содержал возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи и примеси крови. Присутствие в исследуемом материале большого количества слизи и примеси крови могут привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам.

Особенности взятия материала из уретры.

- перед взятием материала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5 – 2 часов;

- непосредственно перед взятием материала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором;

- при наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 минут после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия материала;

- у женщин перед введением зонда в уретру проводится ее массаж о лобковое сочленение;

- в уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0 – 1,5 см, у мужчин – на 3 – 4 см и затем совершается несколько вращательных движений; у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры;

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия материала из цервикального канала.

- перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;

- зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5 – 1,5 см;

- при наличии эрозий цервикального канала необходимо их обработать стерильным физиологическим раствором, и материал следует брать на границе здоровой и измененной ткани;

- при извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание со стенками влагалища.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия секрета предстательной железы.

Перед взятием секрета простаты головка полового члена обрабатывается стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором. Секрет простаты берется после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. Затем из кавернозной части выдавливается простатический секрет, который собирается в стерильную емкость (сосуды с широким горлом, пробирки). После взятия секрета простаты он должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов. Транспортировка биологического материала должна производиться только в сумке-холодильнике.

Особенности взятия (сбора) мочи.

Мочу собирают утром натощак после сна или не ранее чем через 2-3 часа после последнего мочеиспускания.

При сборе мочи желательно использовать специальный контейнер для сбора мочи. Минимальный объем мочи необходимый для проведения анализа составляет 20 мл.

Если в лабораторию доставляется не вся собранная моча, то перед тем, как часть мочи сливается в посуду для транспортировки, ее необходимо тщательно взболтать.

Собранную мочу доставляют в лабораторию в течение 1-3 часов без дополнительного охлаждения. Длительное хранение мочи при комнатной температуре до исследования приводит к изменению не только ее физических свойств и к разрушению клеток, но и к размножению бактерий.

Особенности взятия материала с конъюнктивы глаз.

При наличии обильного гнойного отделяемого его убирают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

Соскоб берут с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. При взятии соскоба необходимо придерживать веко руками, чтобы при моргании ресницы не касались зонда.

Особенности взятия материала с задней стенки глотки.

Одноразовый зонд вводят за мягкое небо в носоглотку и проводят по задней стенке глотки.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладоэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

7.2. Предварительная обработка клинического материала.

Обработка клинического материала для выделения ДНК, а также его хранение производится согласно инструкции производителя набора для выделения ДНК из клинического материала.

7.3. Выделение ДНК.

Для подготовки образцов ДНК могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ реагенты, предназначенные для выделения ДНК из клинического материала для ПЦР-диагностики урогенитальных инфекций.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения ДИПЛЕКС Ct+Ng-PV-120.

8.1.1. Приготовить необходимое число бесцветных пробирок вместимостью 0,2 мл, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

Маркировка пробирок на крышке возможна только для реал-тайм амплификатора Rotor Gene, для всех остальных амплификаторов маркировка пробирок на крышке недопустима! В таком случае пробирки следует расставить в соответствии с заранее подготовленной схемой.

8.1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционной смесью-PV и разбавителем тщательно перемешать.

8.1.3. Из компонентов набора приготовить смесь из расчета на 1 образец (табл.4):

Таблица 4

Компонент	Количество (мкл)
Разбавитель	21
Реакционная смесь-PV	7
Taq-полимераза	0,3

Рекомендуется готовить смесь реагентов не менее чем на 5 реакций. При приготовлении смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

8.1.4. Перемешать амплификационную смесь пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

8.1.5. Внести в приготовленные пробирки по 28 мкл полученной амплификационной смеси.

Перейти к пункту 8.4.

8.2. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения ДИПЛЕКС Ct+Ng TwoStep PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Ng-TwoStep PB-96.

8.2.1. Достать набор из холодильника, подготовить и пронумеровать необходимое количество пробирок с реакционной смесью PB-TS, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

8.2.2. Пробирку с Раствором Taq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

8.2.3. Добавить во все пробирки по 7 мкл Раствора Taq-полимеразы.

Перейти к пункту 8.4.

8.3. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения ДИПЛЕКС Ct+Ng OneStep PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Ng-OneStep PB-96

Данная комплектация не требует предварительной подготовки реагентов и представляет собой полностью готовую амплификационную смесь PB-OS, содержащую Taq-полимеразу и расфасованную в пробирки для проведения реакции.

8.3.1. Достать из коробки и промаркировать необходимое число пробирок, включая пробирки для ПКО ИППП и отрицательного контрольного образца.

8.3.2. Полностью разморозить содержимое пробирок.

При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5 сек. на микроцентрифуге-вортексе.

8.4. Проведение амплификации, все варианты комплектаций.

8.4.1. В пробирки с амплификационной смесью добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 7 мкл:

- а) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;
- б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в) в пробирки положительного контрольного образца – ПКО ИППП.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

8.4.2. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

8.4.3. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующим программам (ниже представлены программы амплификации для комплектаций TwoStep для различных видов амплификаторов):

«CFX 96» (BioRad)
«Rotor-Gene 6000» (Corbett Research)
«Rotor-Gene Q» (QIAGEN)

+80 °C	2 мин*	
+95 °C	1 мин 30 сек	
+95 °C	15 сек	40 циклов
+60 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX)	
+72 °C	40 сек	

«iCycler IQ5» (BioRad)
ДТ-96 (ДНК-Технология)

+80 °C	2 мин*	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	40 циклов
+62 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX)	
+72 °C	20 сек	

* - для комплектаций *Нераскапанный* и *OneStep* раздел программы **+80 °C -2 мин** необязателен.

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора. (www.lytech.ru)

9. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Детекция продуктов амплификации «в реальном времени» осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

9.2. При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации.

9.3. Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Ng**, представлены в таблице 5 на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» ДТ-96 (ДНК-технология, Россия).

Таблица 5

Флуорофор	Возбудитель	Пороговая линия	Конечный цикл (КЦ)
HEX	ДНК человека	20	35
FAM	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	100	35
ROX	<i>Chlamydia trachomatis</i>	20	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца (значение N/A) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла (КЦ). Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6

	Содержание ДНК возбудителя	Ct FAM, ROX	Ct HEX	Результат
ПКО ИППП		22-28	22-28	Реакция прошла
		НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
К-	НЗ или < чувствит	НЗ или > КЦ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	≥ чувствит.	< КЦ	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или < чувствит	НЗ или > КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ .
Исследуем ый образец	≥ чувствит.	< КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.
	НЗ или < чувствит.	НЗ или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.

	Содержание ДНК возбудителя	Ct FAM, ROX	Ct HEX	Результат
ПКО ИППП		22-28	22-28	Реакция прошла
		НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или < чувствит.	НЗ или > КЦ	> КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

9.4. Расчет концентрации ДНК в анализируемом образце.

Внимание! Надежными можно считать концентрации только тех образцов, значения Ct для которых лежат в указанном диапазоне линейности.

Рассчитать концентрацию ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* и – при необходимости – ДНК человека в образце по формуле:

$$C_{\text{Образца}} = C_{\text{ПКО}} * 2^{(Ct_{\text{ПКО}} - Ct_{\text{Образца}})}$$

$C_{\text{Образца}}$ – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце, выраженная в геном-эквивалентах/мл,

$C_{\text{ПКО}}$ – концентрация плазмиды, несущей специфический фрагмент ДНК соответствующего возбудителя (или человека), в ПКО, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору),

$Ct_{\text{Образца}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$Ct_{\text{ПКО}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции положительного контрольного образца с пороговой линией.

Концентрация ДНК возбудителя может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. При этом концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК Chl.tr.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000,$$

концентрация ДНК *Neisseria gonorrhoeae* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК N.gon.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000$$

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК Chl.tr.}}$ - вычисленная концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* в образце

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК N.gon.}}$ - вычисленная концентрация ДНК *Neisseria gonorrhoeae* в образце

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}$ - вычисленная концентрация ДНК человека в образце.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Условия хранения.

Набор ДИПЛЕКС Ct+Ng-PB-120 должен храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 12 месяцев.

Набор ДИПЛЕКС Ct+Ng-TwoStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Ng-TwoStep-PB-96, должен храниться при температуре плюс 2-8°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 9 месяцев.

Набор ДИПЛЕКС Ct+Ng-OneStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Ng-OneStep-PB-96 должен храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 4 месяца.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

10.2. Транспортирование.

Набор реагентов ДИПЛЕКС Ct+Ng транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом, (условия транспортирования соответствуют условиям хранения) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств.

Для набора реагентов ДИПЛЕКС Ct+Ng-PB-120 допустима транспортировка при температуре от плюс 2 до 8 °C в течение 5 дней (не более).

Для набора реагентов ДИПЛЕКС Ct+Ng-TwoStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Ng-TwoStep-PB-96 допустима транспортировка при температуре от плюс 18 до 25 °C в течение 3 дней (не более).

Для набора реагентов ДИПЛЕКС Ct+Ng-OneStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Ng-OneStep-PB-96 допустима транспортировка при температуре от плюс 2 до 8 °C в течение 1 суток (не более) либо в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАБОРА.

Перед проведением анализов от пациентов при использовании новой серии набора реагентов ДИПЛЕКС Ct+Ng необходимо провести контроль качества работы набора.

11.1. Контроль внешнего вида компонентов.

Внешний вид компонентов набора должен соответствовать характеристикам, представленным в таблице 7.

11.2. Контроль аналитической чувствительности набора.

11.2.1. Образцы, необходимые для проведения контроля.

Для определения аналитической чувствительности следует приготовить три образца ОЧ (образец чувствительности).

Для приготовления ОЧ Ct (*Chlamydia trachomatis*) необходимо развести ПКО ИППП в разбавителе до концентрации $5 \cdot 10^2$ ГЭ/мл, исходя из концентрации указанной во вкладыше к набору.

Таблица 7.

№	Маркировка комплектаций	Состав	Внешний вид
1	ДИПЛЕКС Ct+Ng PB-120	1. Реакционная смесь PB 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	Прозрачная жидкость розового цвета Прозрачная вязкая бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость
2	ДИПЛЕКС Ct+Ng OneStep-PB-60	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость
3	ДИПЛЕКС Ct+Ng OneStep-PB-96	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость
4	ДИПЛЕКС Ct+Ng TwoStep-PB-60	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость

		4. Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная вязкая бесцветная жидкость
5	ДИПЛЕКС Ct+Ng TwoStep-PB-96	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная вязкая бесцветная жидкость

Для приготовления ОЧ Ng (*Neisseria gonorrhoeae*) необходимо развести ПКО ИППП в разбавителе до концентрации $5 \cdot 10^2$ ГЭ/мл, исходя из концентрации указанной во вкладыше к набору.

Для приготовления ОЧ ВК (Внутренний контроль, ДНК человека) необходимо развести ПКО ИППП в разбавителе до концентрации $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, исходя из концентрации указанной во вкладыше к набору.

При выполнении разведений необходимо соблюдать два правила:

- 1) не следует одновременно разводить образец более, чем в 10 раз,
- 2) объем отбираемой из образца аликвоты для разведения не должен быть меньше 5 мкл.

Например, для приготовления ОЧ Ct из ПКО с концентрацией $5 \cdot 10^5$ ГЭ/мл необходимо подготовить три пробирки вместимостью 0,5 мл, внести в них по 45 мкл разбавителя. Добавить в первую пробирку 5 мкл ПКО, перемешать 10 секунд на вортексе, центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель. Внести во вторую пробирку 5 мкл из первой пробирки, перемешать 10 секунд на вортексе, центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель. Внести в третью пробирку 5 мкл из второй пробирки, перемешать 10 секунд на вортексе, центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель. Содержимое третьей пробирки использовать в качестве матрицы для анализа.

11.2.2. Проведение анализа.

Провести ПЦР-амплификацию образцов ОЧ Ct, ОЧ Ng, ОЧ ВК и ПКО ИППП в соответствии с протоколом, описанным в разделе 8 данной инструкции для соответствующих вариантов исполнения набора.

11.2.3. Учет и анализ результатов провести в соответствии протоколом, представленным в пунктах 9 данной инструкции.

При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» аналитическая чувствительность считается подтвержденной, если результаты анализа соответствуют данным Таблицы 8.

Результат контроля. Во всех случаях несоответствия получаемых результатов данным Таблицы 8 реагенты признаются непригодными к использованию. При этом осуществляется их полная замена и повторное исследование контрольных образцов до получения положительного результата контрольных испытаний.

Таблица 8.

	Ct FAM (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	Ct ROX (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	Ct HEX (ДНК человека)
пко иппп	значение Ct должно определяться в диапазоне значений, указанном во вкладыше к набору реагентов (22-28)		
К-	НД или > КЦ	НД или > КЦ	НД или > КЦ
ОЧ Ct	любой	<КЦ	любой
ОЧ Ng	<КЦ	любой	любой
ОЧ ВК	любой	любой	<КЦ

12. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

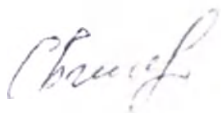
Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают раздавливанием внутренней упаковки с последующим разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка

упаковок как производственный или бытовой мусор. Твердые компоненты подлежат дроблению, последующему разведению водой в соотношении 1:100, сливом раствора в промышленную канализацию и вывозом остатков упаковок как производственного или бытового мусора. Компоненты изделий, нерастворимые в воде, уничтожают путем сжигания.

13. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

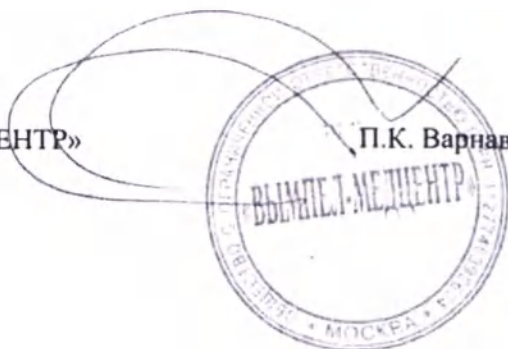
По вопросам, касающимся качества набора ДИПЛЕКС Ng+Tv, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

Рук. производственного отдела
ООО НПФ «Литех»



С.Г.Байцур

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 15 ЛИСТОВ

29 марта 2017 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕХЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов

15 шт.

Директор

Наумов А.Ю.



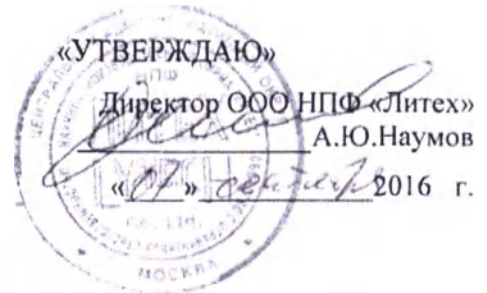
Копия верна
Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
шт.

Директор

Наумов А.Ю.





ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для выявления и идентификации *Chlamydia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis*
методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени
ДИПЛЕКС Ct+Tv для диагностики *in vitro*»
по ТУ 9398-312-17253567-2016

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Tv** предназначен для одновременного выявления и идентификации ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией и возможностью количественной оценки результатов анализа в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, секрет предстательной железы, осадок мочи, отделяемое конъюнктивы).

Область применения набора - дерматовенерология; поддержка клинической лабораторной диагностики инфекций передаваемых половым путем (ИППП).

Показания к применению. Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Tv** может быть использован в клинической лабораторной диагностике для выявления носительства возбудителей ИППП *Chlamydia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis*, а также для оценки эффективности терапии хламидийной и трихомониазной инфекции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Состав набора.

Набор **ДИПЛЕКС Ct+Tv** выпускается в 5 вариантах исполнения.

Варианты исполнения набора различаются степенью готовности реагентов к проведению анализа (нераскапанный, OneStep, TwoStep) (табл. 1).

Таблица 1

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	ДИПЛЕКС Ct+Tv-PB-120	1. Реакционная смесь PB 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 50 мкл 2 пробирки – по 2 мл 1 пробирка – 200 мкл
2	ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-60	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	60 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл
3	ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-96	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	96 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл
4	ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-60	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	60 пробирок по 21 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 500 мкл
5	ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-96	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	96 пробирок по 21 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 800 мкл

Набор рассчитан на проведение анализа 60, 96 или 120 образцов, включая контрольные образцы, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

В состав комплекта набор входят готовые к применению реагенты.

В состав реакционной (амплификационной) смеси входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфических праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (3 зонда): зонд для специфического фрагмента одного возбудителя содержит флуорофор FAM, зонд для специфического фрагмента второго возбудителя содержит флуорофор ROX, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX.
- праймеры для выявления внутреннего контроля (геномная ДНК человека); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения ДНК.

Амплификационная смесь комплекта **OneStep** полностью готова к амплификации, содержит Taq-полимеразу;

Реакционная смесь комплекта **TwoStep** требует внесения Taq-полимеразы, входящей в состав комплекта.

ПКО ИППП представляет собой количественно охарактеризованную смесь 12 плазмид со встроенной вставкой специфических фрагментов геномов возбудителей ИППП (*C.trachomatis*, *T.vaginalis*, *N.gonorrhoeae*, *M.genitalium*, *U.parvum*, *U.urealyticum*, *M.hominis*, *Ureaplasma spp.*, *HSV type 1*, *HSV type 2 CMV*) и человека в диапазоне $5 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^4$ ГЭ/мл. Во вкладыше к каждой серии набора реагентов указана точная концентрация плазмид в образце ПКО ИППП, а также диапазон допустимых значений циклов пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (Ct) для ПКО ИППП на различных типах амплификаторов.

2.2. Принцип метода.

Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Tv** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis* путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 2 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК).
2. Проведение ПЦР-амплификации с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе.

Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце.

При количественной оценке значение Ct (цикл пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией) исследуемого образца сравнивается со значением Ct ПКО (положительного

контрольного образца) с известной концентрацией. Концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* и – при необходимости – ДНК человека в образце вычисляется по формуле:

$$C_{\text{Образца}} = C_{\text{ПКО}} * 2^{(Ct_{\text{ПКО}} - Ct_{\text{Образца}})}$$

$C_{\text{Образца}}$ – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце, выраженная в геном-эквивалентах/мл,

$C_{\text{ПКО}}$ – концентрация плазмиды, несущей специфический фрагмент ДНК соответствующего возбудителя (или человека), в ПКО, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору),

$Ct_{\text{Образца}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$Ct_{\text{ПКО}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции положительного контрольного образца с пороговой линией;

Концентрация ДНК возбудителя может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. При этом концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{1\text{Э/мл}} \text{ ДНК Chl.tr.}}{C_{1\text{Э/мл}} \text{ ДНК человека}} * 100000$$

концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{1\text{Э/мл}} \text{ ДНК Trich.vag.}}{C_{1\text{Э/мл}} \text{ ДНК человека}} * 100000$$

$C_{1\text{Э/мл}} \text{ ДНК Chl.tr.}$ - вычисленная концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* в образце

$C_{1\text{Э/мл}} \text{ ДНК Trich.vag.}$ - вычисленная концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* в образце

$C_{1\text{Э/мл}} \text{ ДНК человека}$ - вычисленная концентрация ДНК человека в образце

Количественная оценка необходима для мониторинга и корректировки лечения, а также для учёта погрешностей, связанных с забором материала.

2.3. Ограничения метода.

1) Метод ПЦР позволяет определять ДНК как в живых, так и в мертвых микроорганизмах. Поэтому ПЦР анализ клинических образцов следует проводить до начала антибиотикотерапии; в случае приема антибиотиков анализ проводится не раньше четырех - пяти недель после завершения курса лечения для определения эффективности терапии.

2) При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с ДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции, а также занижение реального содержания ДНК возбудителя в клиническом образце.

3) Вследствие того, что содержание криптической плазмиды в клетке *Chlamydia trachomatis*, может варьировать от 4 до 9, количественная оценка наличия плазмидной ДНК не может полностью коррелировать с содержанием данного возбудителя в клиническом образце. По этой причине предлагаемый метод определения концентрации позволяет получить лишь оценочное представление о содержании *Chlamydia trachomatis* в клиническом образце.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана производителем при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, HSV 1 и 2 типа, CMV, HPV (типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), а также геномной ДНК человека. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были. Специфичность, рассчитанная как частота ложноположительных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

3.2. Аналитическая чувствительность

С помощью набора ДИПЛЕКС Ct+Tv можно обнаружить:

- $5 \cdot 10^2$ и более геном-эквивалентов/мл *Chlamydia trachomatis* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе;
- 10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Trichomonas vaginalis* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе.

Ген-мишень для *Chlamydia trachomatis* находится на криптической плазмиде, копияность которой варьирует от 4 до 9, за 1 геном-эквивалент производителем набора реагентов принято значение 5.

3.3. Тест на прецизионность

Тест на прецизионность характеризуется рассеянием значений измеренных концентраций, получаемых при использовании набора относительно величины средней концентрации. Для образцов с концентрацией 10^5 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis* и $2 \cdot 10^5$ геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* коэффициент вариации составляет не более 10%.

3.4. Тест на правильность определения концентрации

Тест на правильность определения – при детекции образцов с концентрациями $2 \cdot 10^7$, $2 \cdot 10^5$ и $2 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* и 10^7 , 10^5 и 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis* процент отклонения измеренной концентрации от значения, принимаемого за истинное, находится в диапазоне 90-110%.

3.5. Диапазон линейности

Диапазон линейности – это диапазон концентраций, при детекции которых зависимость между значениями Ct и log концентрации удовлетворяет линейной модели. Модуль коэффициента корреляции для образцов с концентрациями $2 \cdot 10^7$, $2 \cdot 10^5$ и $2 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* и 10^7 , 10^5 и 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis* составляет не менее 0,99. Таким образом, диапазон линейности составляет от $2 \cdot 10^7$ до $2 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* и от 10^7 до 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis*.

4. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Для определения диагностической чувствительности и специфичности были проанализированы 360 образцов отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, 151 образец отделяемого конъюнктивы, 280 образцов осадка мочи и 172 образца секрета предстательной железы, полученных от пациентов с подозрением на урогенитальную инфекцию, с вагинитом, цервицитом, уретритом, конъюнктивитом, простатитом.

4.1. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определялась как доля, выраженная в %, истинно положительных результатов ко всем получившимся положительными, включая ложноположительные и составила 100%. Для расчета нижней границы интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью $C = 90\%$ использовалась следующая формула:

$$(1-C/100)^{1/n} * 100\%, \text{ где:}$$

n – общее число исследуемых проб с истинно положительными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

C – доверительная вероятность, в данном исследовании принята равной 90%. Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 90% составила:

Таблица 2

Возбудитель	Клинический материал	Число образцов с истинно положительным и результатами	Результаты набора ДИПЛЕКС Сt+Tv		Диагностическая чувствительность
			Положительные	Отрицательные	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	122	122	0	98,13-100%
	Отделяемое конъюнктивы	58	58	0	96,11-100%
	Осадок мочи	136	136	0	98,32-100%
	Секрет предстательной железы	69	69	0	96,72-100%
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	93	93	0	97,55-100%
	Осадок мочи	52	52	0	95,67-100%
	Секрет предстательной железы	61	61	0	96,30-100%

4.2. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определялась как доля, выраженная в %, истинно отрицательных ко всем получившимся отрицательными и составила 100%. Для расчета нижней границы интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической специфичности с доверительной вероятностью $C = 90\%$ использовалась следующая формула:

$$(1-C/100)^{1/n} * 100\%, \text{ где:}$$

n – общее число исследуемых проб с истинно положительными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

C – доверительная вероятность, в данном исследовании принята равной 90%. Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 90% составила:

Возбудитель	Клинический материал	Число образцов с истинно отрицательными результатами	Результаты набора ДИПЛЕКС St+Tv		Диагностическая специфичность
			Положительные	Отрицательные	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	238	0	238	99,04-100%
	Отделяемое конъюнктивы	93	0	93	97,55-100%
	Осадок мочи	144	0	144	98,41-100%
	Секрет предстательной железы	103	0	103	97,79-100%
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	267	0	267	99,14-100%
	Осадок мочи	228	0	228	99,00-100%
	Секрет предстательной железы	111	0	111	97,95-100%

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

5.2. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических 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».

5.3. При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует 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 реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III–IV групп

патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для всех вариантов исполнения набора

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5 - 50 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 10 и 100 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

Для комплектаций Нераскапанный РВ дополнительно:

- **бесцветные** одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации.
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 200 и до 1000 мкл;

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

7.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Материал для исследования.

Соскоб из уретры или цервикального канала, секрет предстательной железы, осадок мочи. Для определения ДНК *C.trachomatis* используют также соскоб с конъюнктивы глаз.

Взятие материала осуществляется одноразовым стерильным зондом.

За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры. В связи с тем, что хламидия трахоматис является внутриклеточным паразитом и размножается только внутри клеток цилиндрического эпителия уретры или цервикального канала для получения адекватного результата необходимо, чтобы исследуемый материал содержал возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи и примеси крови. Присутствие в исследуемом материале большого количества слизи и примеси крови могут привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам.

Особенности взятия материала из уретры.

- перед взятием материала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5 – 2 часов;
- непосредственно перед взятием материала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором;
- при наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 минут после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия материала;
- у женщин перед введением зонда в уретру проводится ее массаж о лобковое сочленение;
- в уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0 – 1,5 см, у мужчин – на 3 – 4 см и затем совершается несколько вращательных движений; у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры;

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл

стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия материала из цервикального канала.

- перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;
- зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5 – 1,5 см;
- при наличии эрозий цервикального канала необходимо их обработать стерильным физиологическим раствором, и материал следует брать на границе здоровой и измененной ткани;
- при извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание со стенками влагалища.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия секрета предстательной железы.

Перед взятием секрета простаты головка полового члена обрабатывается стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором. Секрет простаты берется после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. Затем из кавернозной части выдавливается простатический секрет, который собирается в стерильную емкость (сосуды с широким горлом, пробирки). После взятия секрета простаты он должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов. Транспортировка биологического материала должна производиться только в сумке-холодильнике.

Особенности взятия (сбора) мочи.

Мочу собирают утром натощак после сна или не ранее чем через 2-3 часа после последнего мочеиспускания.

При сборе мочи желательно использовать специальный контейнер для сбора мочи. Минимальный объем мочи необходимый для проведения анализа составляет 20 мл.

Если в лабораторию доставляется не вся собранная моча, то перед тем, как часть мочи сливается в посуду для транспортировки, ее необходимо тщательно взболтать.

Собранную мочу доставляют в лабораторию в течение 1-3 часов без дополнительного охлаждения. Длительное хранение мочи при комнатной температуре до исследования приводит к изменению не только ее физических свойств и к разрушению клеток, но и к размножению бактерий.

Особенности взятия материала с конъюнктивы глаз.

При наличии обильного гнойного отделяемого его убирают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

Соскоб берут с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. При взятии соскоба необходимо придерживать веко руками, чтобы при моргании ресницы не касались зонда.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического

материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладоэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

7.2. Предварительная обработка клинического материала.

Обработка клинического материала для выделения ДНК, а также его хранение производится согласно инструкции производителя набора для выделения ДНК из клинического материала.

7.3. Выделение ДНК.

Для подготовки образцов ДНК могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ реагенты, предназначенные для выделения ДНК из клинического материала для ПЦР-диагностики урогенитальных инфекций.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения ДИПЛЕКС Ct+Tv-PB-120.

8.1.1. Приготовить необходимое число бесцветных пробирок вместимостью 0,2 мл, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

Маркировка пробирок на крышке возможна только для реал-тайм амплификатора Rotor Gene, для всех остальных амплификаторов маркировка пробирок на крышке недопустима! В таком случае пробирки следует расставить в соответствии с заранее подготовленной схемой.

8.1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционной смесью-PB и разбавителем тщательно перемешать.

8.1.3. Из компонентов набора приготовить смесь из расчета на 1 образец (табл.4):

Таблица 4

Компонент	Количество (мкл)
Разбавитель	21
Реакционная смесь-PB	7
Taq-полимераза	0,3

Рекомендуется готовить смесь реагентов не менее чем на 5 реакций. При приготовлении смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

8.1.4. Перемешать амплификационную смесь пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

8.1.5. Внести в приготовленные пробирки по 28 мкл полученной амплификационной смеси.

Перейти к пункту 8.4.

8.2. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения ДИПЛЕКС Ct+Tv TwoStep PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep PB-96.

8.2.1. Достать набор из холодильника, подготовить и пронумеровать необходимое количество пробирок с реакционной смесью PB-TS, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

8.2.2. Пробирку с Раствором Taq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

8.2.3. Добавить во все пробирки по 7 мкл Раствора Taq-полимеразы.

Перейти к пункту 8.4.

8.3. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения ДИПЛЕКС Ct+Tv OneStep PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep PB-96

Данная комплектация не требует предварительной подготовки реагентов и представляет собой полностью готовую амплификационную смесь PB-OS, содержащую Taq-полимеразу и расфасованную в пробирки для проведения реакции.

8.3.1. Достать из коробки и промаркировать необходимое число пробирок, включая пробирки для ПКО ИППП и отрицательного контрольного образца.

8.3.2. Полностью разморозить содержимое пробирок.

При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5 сек. на микроцентрифуге-вортексе.

8.4. Проведение амплификации, все комплектации.

8.4.1. В пробирки с амплификационной смесью добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 7 мкл:

- а) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;
- б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в) в пробирки положительного контрольного образца – ПКО ИППП.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

8.4.2. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

8.4.3. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующим программам (ниже представлены программы амплификации для комплектаций TwoStep для различных видов амплификаторов):

«CFX 96» (BioRad)

«Rotor-Gene 6000» (Corbett Research)

«Rotor-Gene Q» (QIAGEN)

+80 °C	2 мин*	
+95 °C	1 мин 30 сек	
+95 °C	15 сек	40 циклов
+60 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX)	
+72 °C	40 сек	

«iCycler IQ5» (BioRad)

ДТ-96 (ДНК-Технология)

+80 °C	2 мин*	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	40 циклов
+62 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX)	
+72 °C	20 сек	

* - для комплектаций Нераскапанный и OneStep раздел программы +80 °C -2 мин необязателен.

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора. (www.lytech.ru)

9. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Детекция продуктов амплификации «в реальном времени» осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

9.2. При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации.

9.3. Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов ДИПЛЕКС St+Tv, представлены в таблице 5 на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» ДТ-96 (ДНК-технология, Россия).

Таблица 5

Флуорофор	Возбудитель	Пороговая линия	Конечный цикл (КЦ)
HEX	ДНК человека	20	35
FAM	<i>Chlamydia trachomatis</i>	100	35
ROX	<i>Trichomonas vaginalis</i>	20	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца (значение N/A) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла (КЦ). Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6

	Содержание ДНК возбудителя	Ct FAM, ROX	Ct HEX	Результат
ПКО ИППП		22-28	22-28	Реакция прошла
		НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
К-	НЗ или < чувствит.	НЗ или > КЦ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	≥ чувствит.	< КЦ	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или < чувствит.	НЗ или > КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ .
Исследуемый образец	≥ чувствит.	< КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.
	НЗ или < чувствит.	НЗ или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.
	НЗ или < чувствит.	НЗ или > КЦ	> КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

9.4. Расчет концентрации ДНК в анализируемом образце.

Внимание! Надежными можно считать концентрации только тех образцов, значения Ct для которых лежат в указанном диапазоне линейности.

Рассчитать концентрацию ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* и – при необходимости – ДНК человека в образце по формуле:

$$C_{\text{Образца}} = C_{\text{ПКО}} * 2^{(Ct_{\text{ПКО}} - Ct_{\text{Образца}})}$$

$C_{\text{Образца}}$ – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце, выраженная в геном-эквивалентах/мл,

$C_{\text{ПКО}}$ – концентрация плазмиды, несущей специфический фрагмент ДНК соответствующего возбудителя (или человека), в ПКО, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору),

$C_{t_{\text{образца}}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$C_{t_{\text{ПКО}}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции положительного контрольного образца с пороговой линией;

Концентрация ДНК возбудителя может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. При этом концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл}} \text{ ДНК Chl.tr.}}{C_{\text{ГЭ/мл}} \text{ ДНК человека}} * 100000,$$

концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл}} \text{ ДНК Trich.vag.}}{C_{\text{ГЭ/мл}} \text{ ДНК человека}} * 100000$$

$C_{\text{ГЭ/мл}} \text{ ДНК Chl.tr.}$ - вычисленная концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* в образце

$C_{\text{ГЭ/мл}} \text{ ДНК Trich.vag.}$ - вычисленная концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* в образце

$C_{\text{ГЭ/мл}} \text{ ДНК человека}$ - вычисленная концентрация ДНК человека в образце.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Условия хранения.

Набор ДИПЛЕКС Ct+Tv-PB-120 должен храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 12 месяцев.

Набор ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-96, должен храниться при температуре плюс 2-8°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 9 месяцев.

Набор ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-96 должен храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 4 месяца.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

10.2. Транспортирование.

Набор реагентов ДИПЛЕКС Ct+Tv транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом, (условия транспортирования соответствуют условиям хранения) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств.

Для набора реагентов ДИПЛЕКС Ct+Tv-PB-120 допустима транспортировка при температуре от плюс 2 до 8 °C в течение 5 дней (не более).

Для набора реагентов ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-96 допустима транспортировка при температуре от плюс 18 до 25 °C в течение 3 дней (не более).

Для набора реагентов ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-96 допустима транспортировка при температуре от плюс 2 до 8 °C в течение 1 суток (не более) либо в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАБОРА.

Перед проведением анализов от пациентов при использовании новой серии набора реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Tv** необходимо провести контроль качества работы набора.

11.1. Контроль внешнего вида компонентов.

Внешний вид компонентов набора должен соответствовать характеристикам, представленным в таблице 7.

11.2. Контроль аналитической чувствительности набора.

11.2.1. Образцы, необходимые для проведения контроля.

Для определения аналитической чувствительности следует приготовить три образца ОЧ (образец чувствительности).

Для приготовления ОЧ Ct (*Chlamydia trachomatis*) необходимо развести ПКО ИППП в разбавителе до концентрации $5 \cdot 10^2$ ГЭ/мл, исходя из концентрации указанной во вкладыше к набору.

Таблица 7.

№	Маркировка комплектаций	Состав	Внешний вид
1	ДИПЛЕКС Ct+Tv PB-120	1. Реакционная смесь PB 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	Прозрачная жидкость розоватого цвета Прозрачная вязкая бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость
2	ДИПЛЕКС Ct+Tv OneStep-PB-60	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость
3	ДИПЛЕКС Ct+Tv OneStep-PB-96	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость
4	ДИПЛЕКС Ct+Tv TwoStep-PB-60	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная вязкая бесцветная жидкость
5	ДИПЛЕКС Ct+Tv TwoStep-PB-96	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная вязкая бесцветная жидкость

Для приготовления ОЧ Tv (*Trichomonas vaginalis*) необходимо развести ПКО ИППП в разбавителе до концентрации $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, исходя из концентрации указанной во вкладыше к набору.

Для приготовления ОЧ ВК (Внутренний контроль, ДНК человека) необходимо развести ПКО ИППП в разбавителе до концентрации $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, исходя из концентрации указанной во вкладыше к набору.

При выполнении разведений необходимо соблюдать два правила:

- 1) не следует одновременно разводить образец более, чем в 10 раз,
- 2) объем отбираемой из образца аликвоты для разведения не должен быть меньше 5 мкл.

Например, для приготовления ОЧ Ct из ПКО с концентрацией $5 \cdot 10^5$ ГЭ/мл необходимо подготовить три пробирки вместимостью 0,5 мл, внести в них по 45 мкл разбавителя. Добавить в первую пробирку 5 мкл ПКО, перемешать 10 секунд на вортексе, центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель. Внести во вторую пробирку 5 мкл из первой пробирки, перемешать 10 секунд на вортексе, центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель. Внести в третью пробирку 5 мкл из второй пробирки, перемешать 10 секунд на вортексе, центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель. Содержимое третьей пробирки использовать в качестве матрицы для анализа.

11.2.2. Проведение анализа.

Провести ПЦР-амплификацию образцов ОЧ Ct, ОЧ Tv, ОЧ ВК и ПКО ИППП в соответствии с протоколом, описанным в разделе 8 данной инструкции для соответствующих вариантов исполнения набора.

11.2.3. Учет и анализ результатов провести в соответствии протоколом, представленным в пунктах 9 данной инструкции.

При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» аналитическая чувствительность считается подтвержденной, если результаты анализа соответствуют данным Таблицы 8.

Результат контроля. Во всех случаях несоответствия получаемых результатов данным Таблицы 8 реагенты признаются непригодными к использованию. При этом осуществляется их полная замена и повторное исследование контрольных образцов до получения положительного результата контрольных испытаний.

Таблица 8.

	Ct FAM (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	Ct ROX (<i>Trichomonas vaginalis</i>)	Ct HEX (ДНК человека)
пко иппп	значение Ct должно определяться в диапазоне значений, указанном во вкладыше к набору реагентов (22-28)		
К-	НД или > КЦ	НД или > КЦ	НД или > КЦ
ОЧ Ct	<КЦ	любой	любой
ОЧ Tv	любой	<КЦ	любой
ОЧ ВК	любой	любой	<КЦ

12. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-8.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают раздавливанием внутренней упаковки с последующим разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор. Твердые компоненты подлежат дроблению, последующему разведению водой в соотношении 1:100, сливом раствора в промышленную канализацию и вывозом остатков упаковок как производственного или бытового мусора. Компоненты изделий, нерастворимые в воде, уничтожают путем сжигания.

13. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

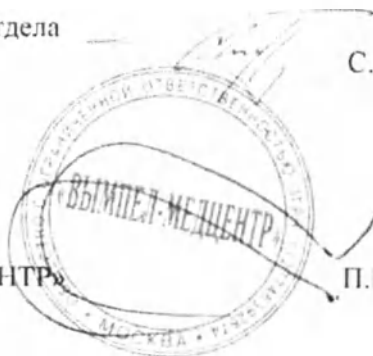
По вопросам, касающимся качества набора ДИПЛЕКС Ct+Tv, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

Рук. производственного отдела
ООО НПФ «Литех»

С.Г.Байцур

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К.Варнавичус



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 14 ЛИСТОВ

«09» 12 2016 год

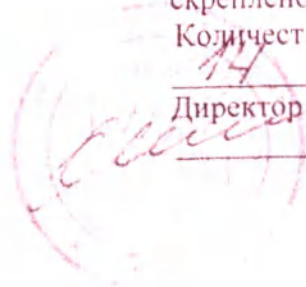
И.и. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варшавичус И.К.



Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
14 шт.

Директор
Наумов А.Ю.



Прошито, проверено,
скреплено печатью.

III.

Директор

Наумов А.Ю.



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю.Наумов

«06» ноября 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики in vitro
«Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала
НК-сорбент для диагностики in vitro»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **НК-сорбент** предназначен для выделения нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) из образцов биологического материала человека (биологические жидкости: отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта и носоглотки, секрет предстательной железы, моча, мокрота, плевральная жидкость, сперма, цельная кровь, сыворотка или плазма, отделяемое из ран, ликвор, синовиальная жидкость, слюна, экссудат; кал; образцы тканей; смывы, мазки и соскобы с оболочек органов и тканей) для последующего анализа полученных препаратов НК методами ПЦР-диагностики (в том числе ПЦР-РВ, ОТ-ПЦР) с целью диагностики наследственных особенностей организма человека или патологий, предполагающей анализ последовательности НК.

Функциональное назначение. Набор **НК-сорбент** представляет собой реагенты для этапа пробоподготовки образцов с целью последующего анализа нуклеиновых кислот и является вспомогательным средством на аналитическом этапе клинических лабораторных исследований по установлению этиологии заболеваний, наследственных особенностей организма или патологий, мониторинга течения болезни и факторов риска патологий, а также проведения санитарно-эпидемиологического контроля.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **НК-сорбент** может быть использован в клинической лабораторной диагностике на этапе пробоподготовки для выделения ДНК и РНК из клинических образцов с целью последующего анализа посредством ПЦР.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА - сотрудники клиничко-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **НК-сорбент** рассчитан на проведение экстракции 100 образцов и выпускается в 8 вариантах исполнения, предназначенных для разных видов клинического материала.

Вариант исполнения «Base» содержит реагенты, предназначенные для экстракции НК из всех видов биологических образцов организма и входит неизменным в состав всех вариантов исполнения набора **НК-сорбент**.

Другие варианты исполнения набора дополнены вспомогательными комплектами, которые учитывают особенности разных видов клинических образцов и предназначены для предварительной обработки материала с целью более полной экстракции НК (табл. 1).

Таблица 1

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1.	«Base»	1. Раствор 1 2. Раствор 2	1 флакон – 45 мл 1 флакон – 40 мл

		3. Раствор 3 4. Раствор 4 5. Раствор для элюции 6. Сорбент 7. ЭВК*	1 флакон – 100 мл 1 флакон – 40 мл 6 пробирок по 2 мл 3 пробирки по 1 мл 1 пробирка – 1100 мкл
2.	«Sputum»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для разжижения мокроты	1 шт. 1 шт.
3.	«Tissue»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для лизиса тканей	1 шт. 1 шт.
4.	«Feces»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для предобработки кала	1 шт. 1 шт.
5.	«Blood»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для предобработки цельной крови	1 шт. 1 шт.
6.	«Serum»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для концентрирования НК	1 шт. 1 шт.
7.	«Urine»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для предобработки цельной мочи	1 шт. 4 шт.
8.	«Complex»	НК-сорбент. Вариант исполнения «Base». Комплект для разжижения мокроты Комплект для лизиса тканей Комплект для предобработки кала Комплект для предобработки цельной крови Комплект для концентрирования НК Комплект для предобработки цельной мочи	1 шт. 1 шт. 1 шт. 1 шт. 1 шт. 1 шт. 1 шт.

*ЭВК – экзогенный внутренний контроль, предназначен для добавления в клинические образцы, обесцененные генетическим материалом человека, для контроля выделения пробы и прохождения ПЦР при использовании наборов производства ООО НПФ «Литех».

Состав вспомогательных комплектов для предобработки клинических образцов.

Таблица 2

№	Название комплекта	Состав	Варианты фасовки
1.	Комплект для разжижения мокроты	1. АЦЦ* 2. Раствор NaOH 3. Раствор цитрата натрия	1 флакон – 0,5 г 1 флакон – 50 мл 1 флакон – 50 мл
2.	Комплект для лизиса тканей	1. Лизирующий раствор 2. Раствор для разведения протеиназы К 3. Протеиназа К	1 флакон – 12 мл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 5 мг
3.	Комплект для предобработки кала	1. Раствор 1 2. Сорбент 3. Раствор для элюции	1 флакон – 45 мл 3 пробирки по 1 мл 5 пробирок по 2 мл
4.	Комплект для предобработки цельной крови	1. Раствор К	1 флакон – 10 мл
5.	Комплект для концентрирования НК	1. Концентрирующий раствор 1 2. Концентрирующий раствор 2	1 флакон – 40 мл 1 флакон – 40 мл
6.	Комплект для предобработки цельной мочи	1. Стабилизатор 2. Раствор Р 3. Сорбент	25 пробирок по 5 г 1 флакон – 30 мл 2 пробирки по 1 мл.

*АЦЦ - N-ацетил-L-цистеин.

Вариант исполнения «Base» содержит готовые к применению реагенты, предназначенные для выделения НК из всех биологических образцов организма.

Выделение НК из биологических жидкостей: отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта и носоглотки, секрета предстательной железы, мочи, сыворотки или плазмы крови, отделяемого из ран, ликвора, синовиальной жидкости, экссудата; промывных вод; смывов, мазков и соскобов с оболочек органов и тканей проводят вариантом исполнения «Base» набора НК-сорбент без дополнительной предварительной обработки исследуемого материала.

Вариант исполнения «**Sputum**» включает, кроме основного варианта исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент**, «Комплект для разжижения мокроты», предназначенный для дополнительной предварительной обработки исследуемого материала (мокроты, плевральной жидкости, спермы), предшествующей экстракции НК.

Вариант исполнения «**Feces**» включает, кроме основного варианта исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент**, дополнительный «Комплект для предобработки кала» и содержит готовые к применению реактивы и предназначен для выделения НК из кала.

Вариант исполнения «**Tissue**» включает основной вариант исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент** и дополнительный «Комплект для лизиса тканей», содержит готовые к применению реактивы и предназначен для выделения НК из биопсийного материала (образцов тканей).

Вариант исполнения «**Blood**» включает, кроме основного варианта исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент**, дополнительный «Комплект для предобработки цельной крови» и содержит готовые к применению реактивы, предназначенные для выделения НК из цельной крови.

Вариант исполнения «**Serum**» включает основной вариант исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент** и дополнительный «Комплект для концентрирования НК» и содержит готовые к применению реактивы, предназначенные для выделения НК из сыворотки или плазмы крови.

Вариант исполнения «**Urine**» включает, кроме основного варианта исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент**, дополнительный «Комплект для предобработки цельной мочи» и содержит готовые к применению реактивы, предназначенные для выделения НК из цельной мочи.

Вариант исполнения «**Complex**», кроме основного варианта исполнения «**Base**» набора **НК-сорбент**, включает дополнительно «Комплект для разжижения мокроты», «Комплект для предобработки кала», «Комплект для лизиса тканей», «Комплект для предобработки цельной крови», «Комплект для концентрирования НК», «Комплект для предобработки цельной мочи» и содержит готовые к применению реактивы, предназначенные для выделения НК из всех видов клинических образцов, заявленных в разделе «Назначение» данной инструкции.

4.2. Принцип метода

Принцип действия набора **НК-сорбент** состоит в обработке клинической пробы лизирующими растворами в присутствии сорбента. В результате происходит разрушение клеточных оболочек и различных внутриклеточных комплексов и высвобождение нуклеиновой кислоты (НК). «Свободная» НК далее связывается с частицами сорбента, в то время как прочие компоненты лизированной клетки удаляются посредством многократных циклов отмывки и центрифугирования. Десорбция НК с сорбента происходит посредством элюции. В результате получается очищенный препарат НК, свободный от ингибиторов ПЦР-реакции, который может быть использован для дальнейшего анализа.

4.3. Ограничения метода и интерферирующие вещества

Выделение генетического материала из клинических образцов осуществляется посредством сорбции НК на пористом силикатном носителе. Поэтому избыточное присутствие в образце примесных веществ, способных взаимодействовать с сорбентом (жиры, липопротеины, компоненты крови), может приводить к уменьшению удельной сорбционной поверхности, тем самым снижая эффективность выделения НК на порядок.

Производителем было показано сохранение эффективности выделения НК в диапазоне 80-100% в случае присутствия в клинических образцах потенциальных интерферирующих веществ в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы, и превышающих их в несколько раз.

Таблица 3

образец	интерферент	допустимое содержание в образце
отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	кровь	10%
	слизь	20%
отделяемое носоглотки и конъюнктивы	кровь	10%

моча	мочевина	150 мМ
	гемоглобин	7,5 мг/л
	белок	2 г/л
	жиры	30%
секрет предстательной железы	кровь	10%
	жиры	30%
ликвор	кровь	10%
	жиры	10%
слюна	кровь	10%
экссудат	белок	80 г/л
синовиальная жидкость	кровь	10%
сперма	кровь	10%
	жиры	50%
мокрота и плевральная жидкость	кровь	30%
сыворотка и плазма крови, цельная кровь	гемоглобин	3 г/л (сыворотка и плазма)
	билирубин	20,5 мкмоль/л
	холестерин	5 ммоль/л
	триглицериды	2,25 ммоль/л
	миоглобин	160 нг/мл
	K2-ЭДТА	1,8 мг/мл
	цитрат натрия	0,129 моль/л
смывы и отделяемое ран	кровь	20%
	гной	25%
кал	полисахариды	25%
	желчные кислоты	100 мг/л
	жир	единичные включения
	мышечные волокна	
	эпителий	
	элементы крови	
	слизь	незначительное
биоптат	кровь	10%
	жир	50%

Снижение эффективности выделения НК наблюдалось в ряде случаев для образцов с содержанием примеси крови 50% и жиров (липопротеинов) 60%. Для клинических образцов подобное содержание примеси крови и жиров встречается крайне редко и свидетельствует о неправильном заборе материала, в том числе по причине критического состояния пациента, кровотечения в месте забора материала, несоблюдении рекомендаций по сдаче анализа (в частности, диеты). Такие образцы должны быть отбракованы на преаналитическом этапе анализа и не подвергаться дальнейшему исследованию.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Эффективность выделения

Эффективность выделения НК из клинических образцов с помощью набора **НК-сорбент** составляет 80-100%.

5.2. Качество (чистота) препарата экстрагированной НК.

Набор **НК-сорбент** позволяет получить препарат НК хорошего качества очистки (чистоты), достаточного для последующего проведения исследований методами ПЦР (в том числе ОТ-ПЦР, ПЦР-РВ).

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Корреляция результатов клинических испытаний, проведенных на НК, выделенных из 450 клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, отделяемого конъюнктивы, отделяемое слизистой оболочки носоглотки, мочи, секрет предстательной железы, ликвор, слюна, экссудат, синовиальная жидкость, сперма, сыворотка и плазма крови, мокрота, плевральная жидкость, цельная кровь, кал, биоптат, смывы из ротоглотки, отделяемое ран), наборами реагентов сравнения «ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС», «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА», «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» и исследуемым набором реагентов «НК-сорбент», является высокой, что свидетельствует о получении в результате экстракции набором **НК-сорбент** нуклеиновых кислот надлежащего качества и очистки (отсутствие ингибиторов ПЦР) для молекулярной диагностики и сопоставимости эффективности выделения ДНК и РНК из образцов клинического материала при использовании сравниваемых медицинских изделий.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических 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 всегда следует выполнять следующие требования:

7.1.1. Следует 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».

7.1.2. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

7.1.3. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

7.1.4. Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

7.1.5. При работе с Раствором 1 и Раствором 2 следует выполнять следующие требования: избегать прямого контакта реагентов с глазами, кожей и одеждой. Реагент может вызывать раздражение глаз, кожи и слизистых оболочек; в случае контакта с реагентом, немедленно промыть кожу большим количеством воды; при контакте реагента с глазами промыть большим количеством воды и немедленно обратиться за медицинской помощью; если реагент случайно проглочен, немедленно вызвать врача!

7.1.6. При работе с Раствором 3 и Раствором 4 строго соблюдать правила противопожарной безопасности.

7.1.7. Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III–IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

7.1.8. Не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

7.2.1. Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

7.2.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

7.2.3. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

7.2.4. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

7.2.5. Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для всех вариантов исполнения набора:

- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- микроцентрифуга, развивающая ускорение до 12000 об/мин (16000 g), "MiniSpin" (фирма Eppendorf, Германия);
- микроцентрифуга-вортекс на 1500-3000 об/мин "FV-2400" (фирма "Биосан", Латвия);
- центрифуга, развивающая ускорение до 3500 об/мин «СМ-6М» (фирма ELMi, Латвия);
- твердотельный термостат «Термит» («ДНК-технология», Россия);
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с переменным или фиксированным объемом, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (ошибка не более 3%) (фирма «ТермоЭлектрон», Россия);
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- одноразовые наконечники без фильтра до 100 или до 200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 1000;
- аспиратор с колбой-ловушкой для отбора надосадочной жидкости;
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл, 15,0 мл;
- холодильник для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

Дополнительно для комплектий «Complex» и «Sputum»:

- весы лабораторные II класса точности с дискретностью 0,01 г.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

9.1. Материал для исследования

Материалом для экстракции набором **НК-сорбент** являются клинические образцы биологического материала человека (биологические жидкости: отделяемое слизистых оболочек

урогенитального тракта и носоглотки, секрет предстательной железы, моча, мокрота, плевральная жидкость, сперма, цельная кровь, сыворотка или плазма, отделяемое из ран, ликвор, синовиальная жидкость, слюна, экссудат; кал; образцы тканей; смывы, мазки и соскобы с оболочек органов и тканей).

9.2. Взятие биологического материала.

9.2.1. Общие рекомендации по взятию биоматериала.

9.2.1.1. Взятие биоматериала производится из предполагаемого места обитания микроорганизма.

9.2.1.2. Объем отбираемого биоматериала не должен быть избыточным. При взятии мазков и соскобов достаточно получить материал в объеме «спичечной головки». Идеальный инструмент для взятия соскобов и мазков — специальный урогенитальный зонд (щеточка), который собирает необходимое количество эпителия, не травмируя слизистую. Присутствие в исследуемом материале большого количества слизи и примеси крови могут привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам.

9.2.1.3. Для взятия проб необходимо пользоваться только одноразовым инструментом и стерильными пластиковыми контейнерами (или пробирками) с плотно закрывающейся крышкой.

9.2.1.4. При подготовке проб НК для диагностики инфекционных заболеваний взятие биоматериала, по возможности, должно проводиться в период обострения инфекции. За 10 дней до исследования необходимо прекратить прием химиопрепаратов, антибиотиков, средств гормональной терапии. Контроль эффективности лечения должен проводиться не ранее чем через 3-4 недели после окончания терапии.

9.2.2. Материал из уретры (соскоб эпителиальных клеток).

9.2.2.1. Перед взятием материала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5-2 часов.

9.2.2.2. Непосредственно перед взятием материала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором.

При наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 мин. после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия материала.

9.2.2.3. У женщин перед введением зонда в уретру проводится ее массаж о лобковое сочленение.

В уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0-1,5 см, у мужчин — на 3-4 см, и затем делается несколько осторожных вращательных движений. У детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры.

9.2.2.4. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.3. Материал из цервикального канала (соскоб эпителиальных клеток).

9.2.3.1. Перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором.

9.2.3.2. Зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5-1,5 см, материал собирается осторожными вращательными движениями. При извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание со стенками влагалища.

При наличии эрозий цервикального канала необходимо их обработать стерильным физиологическим раствором, материал следует брать на границе здоровой и измененной ткани.

9.2.3.3. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф

вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.4. Материал из влагалища (мазок с заднего свода).

9.2.4.1. Материал должен быть взят до проведения мануального исследования. Зеркало перед манипуляцией можно смочить горячей водой, применение антисептиков для обработки зеркала противопоказано.

9.2.4.2. В случае избытка слизи или обильных выделений необходимо удалить их стерильным ватным тампоном.

9.2.4.3. Влагалищное отделяемое собирают стерильным одноразовым зондом из заднего нижнего свода или с патологически измененных участков слизистой. У девочек материал нужно забирать со слизистой оболочки преддверия влагалища, в отдельных случаях — из заднего свода влагалища через гименальные кольца.

9.2.4.4. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.5. Секрет предстательной железы.

9.2.5.1. Перед взятием секрета простаты головка полового члена обрабатывается стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

9.2.5.2. После предварительного массажа простаты через прямую кишку врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке полового члена.

9.2.5.3. Затем из кавернозной части выдавливается 0,5-1 мл простатического секрета, который собирается в сухую стерильную ёмкость.

9.2.6. Сперма (семенная жидкость).

Взятие спермы осуществляют в стерильный одноразовый флакон.

9.2.7. Моча.

В зависимости от назначения исследования возможно проведение анализа образцов цельной мочи или осадка мочи на наличие ДНК и РНК патогенов или мониторинга патсостояний.

9.2.7.1. Для получения осадка мочи среднюю часть утренней порции или всю утреннюю порцию мочи собирают утром натощак после тщательного туалета гениталий в сухой стерильный флакон с плотно завинчивающейся крышкой. Минимальный объем мочи, необходимый для проведения анализа, составляет 20 мл. Если в лабораторию доставляется не вся собранная моча, то перед тем, как часть мочи сливается в посуду для транспортировки, ее необходимо тщательно взболтать.

9.2.7.2. Для исследования цельной мочи собрать порцию мочи в одноразовый пластиковый контейнер для сбора мочи, перемешать образец мочи переворачиванием и перелить в пробирку со стабилизатором, входящую в состав «Набора для предобработки цельной мочи», до уровня 10 мл (допустима погрешность ± 2 мл). Содержимое пробирки тщательно перемешать переворачиванием до полного растворения порошка стабилизатора.

9.2.8. Материал с конъюнктивы глаз (соскоб).

9.2.8.1. При наличии обильного гнойного отделяемого его убирают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

9.2.8.2. Соскоб берут с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. При взятии соскоба необходимо придерживать веко руками, чтобы при моргании ресницы не касались зонда.

9.2.8.3. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

97.2.9. Материал с задней стенки глотки (мазок).

9.2.9.1. Взятие материала проводится натощак или не ранее, чем через 2-4 часа после еды.

9.2.9.2. Одноразовый зонд вводят за мягкое небо в носоглотку и проводят по задней стенке глотки.

Если целью исследования являются миндалины, зонд вводится в лакуны миндалин и там ротируется.

9.2.9.3. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.10. Материал из носоглотки (мазок).

9.2.10.1. Взятие материала проводится натощак или не ранее, чем через 2-4 часа после еды.

9.2.10.2. При взятии материала необходимо хорошее освещение, пациент сидит против источника света, корень языка придавливают шпателем, материал берут стерильным зондом, не касаясь языка, слизистой щек и зубов.

9.2.10.3. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.11. Материал из зубодесневых каналов (мазок).

Мазки из зубодесневого кармана с помощью зонда собираются в стерильную пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора. Зонд тщательно отмывают и удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.12. Ректальный мазок.

В прямую кишку вводят стерильный одноразовый зонд, вращательными движениями собирают материал. После взятия материала зонд переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с 0,5 – 1 мл физ.раствора или в пробирку с транспортной средой и тщательно отмывают, далее зонд удаляют, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.13. Слюна.

9.2.13.1. За 12 часов до взятия (сбора) слюны исключается прием пищи, алкоголя и лекарственных препаратов. Непосредственно перед сбором слюны необходимо исключить использование зубной пасты и удалить зубные протезы. Перед тем, как собрать слюну, необходимо почистить зубы без зубной пасты, затем хорошо прополоскать рот без использования раздражающих средств.

9.2.13.2. Слюну выплевывают или отсасывают со дна рта одноразовым шприцем и переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл.

9.2.14. Ликвор.

Ликвор получают путем прокола поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами. Переносят 1,0 мл ликвора в одноразовую стерильную пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл.

9.2.15. Синовиальная жидкость.

Для забора синовиальной жидкости выполняют пункцию сустава. Переносят 1,0 мл пункции в одноразовую стерильную пробирку типа «Эппендор» объемом 1,5 мл.

9.2.16. Экссудат.

Забор экссудата осуществляют с помощью пункции исследуемой области, а также через дренажи. Переносят 1,0 мл забранного экссудата в одноразовую стерильную пробирку типа «Эппендор» объемом 1,5 мл.

9.2.17. Мокрота.

Взятие мокроты осуществляют утром натощак до выполнения гигиенических процедур при глубоком откашливании в количестве не менее 0,5 мл в стерильный одноразовый флакон с широким горлом, закрывающийся крышкой, объемом не менее 50 мл.

9.2.18. Плевральная жидкость.

Плевральную жидкость получают путем прокола плевральной полости одноразовой пункционной иглой. Пункцию в количестве не менее 0,5 мл переносят в стерильный одноразовый флакон с широким горлом, закрывающийся крышкой, объемом не менее 50 мл.

9.2.19. Промывные воды бронхов, желудка, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ).

9.2.19.1. Промывные воды бронхов, БАЛ собирают в одноразовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 50 мл.

9.2.19.2. Промывные воды желудка следует брать натощак. Последний приём пищи должен быть не менее чем за 12 часов до взятия промывных вод желудка. Перед взятием материала для нейтрализации содержимого желудка пациент выпивает 100-150 мл раствора пищевой соды (1 чайная ложка на 1 стакан воды) на стерильной дистиллированной воде, после чего в желудок проводят стерильный желудочный зонд и собирают содержимое желудка в одноразовую плотно закрывающуюся пробирку объемом 50 мл.

9.2.20. Смыв из ротоглотки.

9.2.20.1. Предварительно прополоскать полость рта водой.

9.2.20.2. Прополоскать ротоглотку 8-10 мл стерильного физ. Раствора в течение 10-15 сек, собрать смыв через воронку в стерильную пробирку объемом 50 мл.

9.2.21. Смыв из полости носа.

Ввести с помощью шприца по 3-5 мл стерильного физ. Раствора в оба носовых хода, собрать смыв через воронку в стерильную пробирку объемом 50 мл.

9.2.22. Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта и носоглотки, ран.

Материал из носовой полости забирают сухим стерильным ватным тампоном, который вводят вглубь полости. После взятия материала тампон переносят в пробирку с 0,5 – 1 мл физ.раствора или с транспортной средой, пробирку закрывают и маркируют, после чего материал доставляют в лабораторию.

9.2.23. Кал.

Материал собирается без подготовки в чистый, сухой контейнер с широким горлышком и с плотно закрывающейся крышкой. Кал собирают после самостоятельной дефекации в небольших количествах, из разных участков каловых масс.

9.2.24. Буккальный соскоб.

9.2.24.1. Забор буккального эпителия следует осуществлять не ранее, чем через час после еды, питья, а также курения. Перед забором материала необходимо хорошо прополоскать рот без использования раздражающих средств.

9.2.24.2. Взятие материала проводят при помощи специального одноразового инструмента (ватной палочки) путем соскоба эпителиальных клеток с внутренней поверхности щеки. Конеч ватной палочки прислонить к внутренней стороне щеки и вращать в течение 10 секунд с небольшим нажимом. Образец готов для выделения НК.

При использовании обычной ватной палочки с двумя ватными концами неиспользованный конец следует отрезать! На всех этапах взятия соскоба категорически запрещается трогать используемый ватный конец руками, а также допускать его контакт с любыми поверхностями, за исключением внутренней поверхности пакета/конверта для хранения.

9.2.25. Биопсийный материал (образцы ткани).

Взятие материала осуществляют из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с повреждением участка. Материал помещают в одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

9.2.26. Цельная кровь.

2-3 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку, содержащую порошок или раствор антикоагулянта (1,2 – 2,0 мг K_2 -ЭДТА или 3,8% (0,129 моль/л) раствор цитрата натрия). ГЕПАРИН ИСПОЛЬЗОВАТЬ НЕЛЬЗЯ!).

При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с фиолетовой крышкой (ЭДТА) или голубой (цитрат натрия).

9.2.27. Плазма крови.

2-3 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку, содержащую порошок или раствор антикоагулянта (1,2 – 2,0 мг K_2 -ЭДТА или 3,8% (0,129 моль/л) раствор цитрата натрия). ГЕПАРИН ИСПОЛЬЗОВАТЬ НЕЛЬЗЯ!).

При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с фиолетовой крышкой (с ЭДТА).

9.2.28. Сыворотка крови.

2-3 мл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пустую пробирку.

При использовании системы вакуумного забора крови используются вакутейнеры с красной крышкой (для получения сыворотки).

9.3. Транспортировка и хранение биологического материала.

Таблица 4.

Биоматериал	Транспортировка	Хранение
мазки, соскобы, отделяемое ран, отделяемое слизистых оболочек кал, сперма, секрет предстательной железы	Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике.	Допускается хранение биопроб при +4...+8°C не более 1 суток,
моча для осадка	Собранную мочу доставляют в лабораторию в течение 1-3 часов без дополнительного охлаждения. Для получения осадка исходный материал должен быть доставлен в лабораторию как можно быстрее.	<i>Не охлаждать и не замораживать!</i> Моча для исследования должна быть свежей.
цельная моча	Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, для выделения РНК допустима транспортировка до 5 суток. Транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике.	Допускается хранение биопроб при +4...+8°C не более 1 суток, для выделения РНК допустимо хранение до 5 суток (включая транспортировку).

слюна, ликвор, синовиальная жидкость, экссудат, смывы, промывные воды мокрота, плевральная жидкость	Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике.	<i>Не замораживать!</i> Материал для исследования должен быть свежим. Допускается хранение биопроб при +4...+8°C не более 1 суток.
плазма крови, сыворотка крови цельная кровь	Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике.	<i>Не замораживать!</i> Допускается хранение биопроб при +4...+8°C не более 1 суток.
буккальный соскоб	Если образец предполагается хранить или транспортировать, то палочку следует высушить на воздухе при комнатной температуре в течение трех часов, затем упаковать в промаркированный герметичный пакет или бумажный конверт. Транспортировка производится в обычных условиях.	Допускается хранение биопроб при комнатной температуре не более 1 суток.
биопсийный материал (образцы ткани)	Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов, транспортировка должна производиться только в сумке-холодильнике с дополнительным хладэлементом.	Допускается хранение биопроб при +4...+8°C не более 1 суток.

10. ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСТРАКЦИИ.

10.1. Процедура выделения НК из образцов мазков, соскобов, отделяемого слизистых оболочек и ран.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.1.1. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.1.2. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1.

10.1.3. Внести в каждую пробирку по 100 мкл образца.

10.1.4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.1.5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.1.6. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.1.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.1.8. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.1.9. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.1.10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.1.11. Повторить п.10.1.10.

10.1.12. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.1.13. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.1.14. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.1.15. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.2. Процедура выделения НК из образцов буккального соскоба.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.2.1. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.2.2. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1.

10.2.3. Поместить в соответствующие пробирки палочки с буккальным соскобом ватным кончиком вниз. Отрезать палочки под крышку, закрыть пробирку и вортексировать 10 секунд. Инкубировать при комнатной температуре 5-10 минут. Открыть крышку, дополнительно поболтать палочку и аккуратно вынуть ее пинцетом, прижимая к внутренним стенкам пробирки для отжима из нее жидкости. Перед каждым новым образцом пинцет следует промывать.

10.2.4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.2.5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.2.6. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.2.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.2.8. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.2.9. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.2.10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.2.11. Повторить п. 10.2.10.

10.2.12. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.2.13. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.2.14. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.2.15. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.3. Процедура выделения НК из образцов слюны, ликвора, синовиальной жидкости, секрета предстательной железы, экссудата.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.3.1. Отцентрифугировать пробирки с образцами в течение 10-15 минут на микроцентрифуге при максимальных оборотах.

10.3.2. Тщательно удалить пипеткой верхний слой жидкости, оставив на дне около 20-30 (но не более 50) мкл.

10.3.3. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1 и по 10 мкл ЭВК.

10.3.4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.3.5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.3.6. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.3.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.3.8. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.3.9. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.3.10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10

тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.3.11. Повторить п. 10.3.10.

10.3.12. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.3.13. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.3.14. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.3.15. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.4. Процедура выделения НК из образцов смывов и промывных вод.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.4.1. Весь объем образца смыва тщательно взболтать, отобрать 10-15 мл в стерильную центрифужную пробирку.

10.4.2. Отцентрифугировать пробирки с образцами в течение 15-20 минут при 1500-3000 об/мин на центрифуге. Надосадочную жидкость осторожно удалить, стараясь не захватить на дне 0,5-1 мл суспензии.

10.4.3. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов. Перенести суспензию осадка (0,5-1 мл) в соответствующую чистую пробирку на 1,5 мл, пробирку плотно закрыть и центрифугировать при максимальных об/мин при комнатной температуре в течение 15 сек на микроцентрифуге. Тщательно удалить пипеткой надосадочную жидкость.

10.4.4. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1 и по 10 мкл ЭВК.

10.4.5. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.4.6. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.4.7. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.4.8. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.4.9. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.4.10. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.4.11. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.4.12. Повторить п. 10.4.11.

10.4.13. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.4.14. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.4.15. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.4.16. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.5. Процедура выделения НК из образцов мочи.

В зависимости от назначения исследования возможно проведение анализа образцов целевой мочи или осадка мочи на наличие ДНК и РНК патогенов или мониторинга патосостояний.

10.5.1. Процедура выделения НК из осадка мочи.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.5.1.1. Весь объем порции мочи тщательно взболтать, отобрать 10-15 мл в стерильную центрифужную пробирку.

10.5.1.2. Отцентрифугировать пробирки с образцами в течение 15-20 минут при 1500-3000 об/мин на центрифуге. Надосадочную жидкость осторожно удалить, стараясь не захватить на дне 0,5-1 мл суспензии.

10.5.1.3. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов. Перенести суспензию осадка (0,5-1 мл) в соответствующую чистую пробирку на 1,5 мл, пробирку плотно закрыть и центрифугировать при максимальных об/мин при комнатной температуре в течение 15 сек на микроцентрифуге. Тщательно удалить пипеткой надосадочную жидкость.

В случае охлаждения образца исходной мочи рекомендуется однократно промыть осадок мочи: добавить к осадку 200-300 мкл физ. раствора, ресуспендировать на вортексе, отцентрифугировать и удалить надосадочную жидкость.

10.5.1.4. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1.

10.5.1.5. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.5.1.6. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.5.1.7. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.5.1.8. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.1.9. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.5.1.10. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.1.11. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.1.12. Повторить п. 10.5.1.11.

10.5.1.13. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.1.14. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.5.1.15. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.5.1.16. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.5.2. Процедура выделения НК из цельной мочи.

Для вариантов исполнения «Complex» и «Urine» набора НК-сорбент.

10.5.2.1. Подготовка образцов к экстракции НК.

Для предварительной обработки образцов мочи использовать «Комплект для предобработки цельной мочи».

Внимание! В процессе хранения Раствор Р может расслаиваться, перед применением необходимо перемешать его переворачиванием.

10.5.2.1.1. В пробирки из набора с образцами мочи (10 мл) добавить по 1 мл Раствора Р, тщательно перемешать переворачиванием.

10.5.2.1.2. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, добавить в пробирки с образцами по 50 мкл ресуспендированного сорбента (из Комплекта для предобработки цельной мочи или набора «НК-сорбент» комплектации «Base»), перемешать переворачиванием.

10.5.2.1.3. Инкубировать пробирки с образцами при комнатной температуре 5 минут.

10.5.2.1.4. Отцентрифугировать 10 минут при 3500 об/мин на центрифуге. Удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой, либо перелив через край в емкость с дезинфицирующим раствором (например, аламинолом).

10.5.2.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов мочи проводить с использованием комплектации «Base» набора НК-сорбент.

10.5.2.2.1. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.5.2.2.2. Добавить в пробирки с образцами по 400 мкл раствора 2, перемешать пипетированием до полного ресуспендирования сорбента, перенести суспензию в соответствующие чистые пробирки на 1,5 мл, используя отдельные наконечники для каждого образца.

10.5.2.2.3. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.2.2.4. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.2.2.5. Повторить п. 10.5.2.2.4.

10.5.2.2.6. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.5.2.2.7. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 10 минут.

10.5.2.2.8. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.5.2.2.9. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на микроцентрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК и РНК, в том числе мРНК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года, мРНК будет стабильна в образце при -18...-20°C в течение 1 недели.

10.6. Процедура выделения НК из образцов плазмы и сыворотки крови.

В зависимости от назначения исследования пробоподготовка образцов плазмы и сыворотки крови возможна базовым методом для последующего скрининга наличия ДНК и РНК патогенов или с дополнительным этапом концентрирования образцов для повышения чувствительности последующего анализа ДНК и РНК абсолютных патогенов.

10.6.1. Получение плазмы крови.

10.6.1.1. При использовании вакутейнера с ЭДТА для получения плазмы пробирку с кровью отстаивают не менее 1 часа при температуре +2° до +8°C. После этого кровь должна расслоиться на плазму и форменные элементы.

Если кровь не расслоилась, перемешать кровь переворачиванием и отобрать 1,5 мл крови в стерильную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл. Центрифугировать пробирку 5 мин при 5000 об/мин.

10.6.1.2. Не задевая интерфазу отдельными наконечниками с фильтром перенести плазму в чистую полипропиленовую пробирку.

Полученную плазму использовать для выделения НК. Плазму крови можно хранить при температуре не выше минус 18°C не более 1 месяца.

10.6.2. Получение сыворотки крови.

10.6.2.1. При использовании вакутейнера без антикоагулянта для получения сыворотки пробирку с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37°C на 15 мин.

10.6.2.2. Сыворотку перенести отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

Полученную сыворотку использовать для выделения НК. Сыворотку крови можно хранить при температуре не выше минус 18°C не более 1 месяца.

10.6.3. Процедура выделения НК из образцов плазмы и сыворотки крови базовая.

Для варианта исполнения «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.6.3.1. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.6.3.2. Внести в каждую пробирку по 450 мкл раствора 1 и по 10 мкл ЭВК.

10.6.3.3. Внести в каждую пробирку по 100 мкл образца.

10.6.3.4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.6.3.5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.6.3.6. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.6.3.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.3.8. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.6.3.9. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.3.10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.3.11. Повторить п. 10.6.3.10.

10.6.3.12. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10

тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.3.13. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.6.3.14. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.6.3.15. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.6.4. Процедура выделения НК из образцов плазмы и сыворотки крови с концентрированием.

Для вариантов исполнения «Complex» и «Serum» набора НК-сорбент.

10.6.4.1. Подготовка образцов к экстракции.

Для предварительной обработки образцов плазмы и сыворотки крови использовать «Комплект для концентрирования НК».

10.6.4.1.1. Исследуемые образцы сыворотки или плазмы крови перемешать и осадить капли с крышек центрифугированием в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

10.6.4.1.2. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.6.4.1.3. Внести по 800 мкл исследуемой сыворотки или плазмы крови в соответствующие пробирки на 1,5 мл.

10.6.4.1.4. Внести в пробирки по 350 мкл Концентрирующего раствора 1 и 350 мкл Концентрирующего раствора 2. Предварительно смешивать данные растворы не следует!

10.6.4.1.5. Содержимое пробирок тщательно перемешать и инкубировать 10 минут при комнатной температуре.

10.6.4.1.6. Отцентрифугировать пробирки 5 минут при 3 000 об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя аспиратор с колбой-ловушкой.

10.6.4.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов сыворотки и плазмы крови проводить с использованием «Комплекта для концентрирования НК» и комплектации «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.6.4.2.1. Добавить к осадку в пробирках (п. 8.6.4.1.6) по 450 мкл раствора 1 и по 10 мкл ЭВК.

10.6.4.2.2. Пробирки закрыть и тщательно перемешать на вортексе в течение 2-х минут до растворения большей части осадка, осадить капли с крышек пробирок центрифугированием в течение 3-5 секунд на вортексе.

10.6.4.2.3. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.6.4.2.4. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.6.4.2.5. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.6.4.2.6. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.4.2.7. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.6.4.2.8. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.4.2.9. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.4.2.10. Повторить п. 10.6.4.2.9.

10.6.4.2.11. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.6.4.2.12. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.6.4.2.13. Добавить в пробирки по 80 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.6.4.2.14. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.7. Процедура выделения НК из образцов цельной крови.

Для вариантов исполнения «Complex» и «Blood» набора НК-сорбент.

10.7.1. Подготовка образцов к экстракции НК.

Для предварительной обработки образцов цельной крови использовать «Комплект для предобработки цельной крови» и набор **НК-сорбент** комплектации **«Base»**.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.7.1.1. Предварительно перемешать пробирку с цельной кровью на вортексе 5-10 сек., осадить капли с крышки пробирки коротким центрифугированием на вортексе.

10.7.1.2. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл с замком по числу образцов.

10.7.1.3. В пробирку на 1,5 мл с замком внести по 450 мкл раствора 1, по 100 мкл раствора К и 50 мкл соответствующего образца крови. Перемешать содержимое пробирки на вортексе 5-10 сек., осадить капли с крышки пробирки коротким центрифугированием.

10.7.1.4. Прогреть пробирки при 99°C в течение 10 минут.

10.7.1.5. Отцентрифугировать пробирки 1 минуту при 13-14 тыс.об/мин на микроцентрифуге.

10.7.1.6. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл с замком по числу образцов. Перенести супернатант (надосадок) в соответствующую чистую пробирку на 1,5 мл.

10.7.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов цельной крови проводить с использованием комплектации «Base» набора НК-сорбент.

10.7.2.1. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.7.2.2. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.7.2.3. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.7.2.4. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадоочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.7.2.5. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.7.2.6. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадоочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.7.2.7. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадоочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.7.2.8. Повторить п. 10.7.2.7.

10.7.2.9. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадоочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.7.2.10. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.7.2.11. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.7.2.12. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадоочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.8. Процедура выделения НК из образцов кала.

Для вариантов исполнения «Complex» и «Feces» набора НК-сорбент.

10.8.1. Подготовка образцов к экстракции НК.

Для предварительной обработки образцов кала использовать «Комплект для предобработки кала» и набор **НК-сорбент** комплектации **«Base»**.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.8.1.1. Из исследуемых образцов кала приготовить суспензии в физ.растворе с концентрацией 1 г/мл.

10.8.1.2. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.8.1.3. Внести в пробирки на 1,5 мл по 450 мкл раствора 1 (из «Комплекта для предобработки кала» или набора **НК-сорбент** комплектации **«Base»**) и 200 мкл соответствующей приготовленной суспензии образца кала с помощью индивидуального наконечника с широким отверстием.

10.8.1.4. Перемешать содержимое пробирок на вортексе, осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

10.8.1.5. Прогреть пробирки в термостате при 70°C в течение 10 минут.

10.8.1.6. Отцентрифугировать пробирки в течение 1 минуты при 13-14 тыс.об/мин на микроцентрифуге.

10.8.1.7. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.8.1.8. Перенести надосадочную жидкость в соответствующую чистую пробирку на 1,5 мл, используя индивидуальный наконечник.

10.8.1.9. Внести в пробирки по 450 мкл раствора 1(из «Комплекта для предобработки кала» или набора **«Base»**) и по 10 мкл ЭВК (из набора **НК-сорбент** комплектации **«Base»**).

10.8.1.10. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 50 мкл ресуспендированного сорбента (из «Комплекта для предобработки кала» или набора **НК-сорбент** комплектации **«Base»**).

10.8.1.11. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.8.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов кала проводить с использованием комплектации **«Base»** набора **НК-сорбент**.

10.8.2.1. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.8.2.2. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.8.2.3. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.8.2.4. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.8.2.5. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.8.2.6. Повторить п. 10.8.2.5.

10.8.2.7. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.8.2.8. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.8.2.9. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.8.2.10. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.9. Процедура выделения НК из образцов спермы, мокроты и плевральной жидкости.

Для вариантов исполнения «Complex» и «Sputum» набора «НК-сорбент».

10.9.1. Подготовка образцов к экстракции НК.

Для предварительной обработки образцов спермы, мокроты и плевральной жидкости использовать «Комплект для разжижения мокроты».

10.9.1.1. Приготовить раствор NALC следующего состава (из расчета на 10 мл):

50,0 мг АЦЦ

5 мл раствора NaOH

5 мл раствора цитрата натрия

Раствор готовится в день использования (раствор не хранится!)

10.9.1.2. Подготовить и промаркировать чистые пробирки объемом 2 мл по числу образцов.

10.9.1.3. Перенести 0,5 – 1,0 мл исследуемого образца в соответствующую чистую пробирку.

10.9.1.4. К исследуемым образцам в пробирках добавить равный объем раствора NALC, перемешать вортексированием в течение 5-20 сек.

10.9.1.5. Инкубировать пробирки 15 мин при комнатной температуре.

10.9.1.6. Отцентрифугировать пробирки в течение 15 минут при 13000 об/мин на микроцентрифуге, удалить надосадочный раствор отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой.

10.9.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов спермы, мокроты и плевральной жидкости проводить с использованием комплектации «Base» набора НК-сорбент.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8°C) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.9.2.1. Добавить в пробирки с предварительно обработанными образцами (п. 8.9.1.6) по 450 мкл раствора 1 и по 10 мкл ЭВК, перемешать до полного растворения осадка вортексированием или пипетированием, используя отдельные наконечники для каждого образца.

10.9.2.2. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.9.2.3. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.9.2.4. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.9.2.5. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.9.2.6. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.9.2.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.9.2.8. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.9.2.9. Повторить п. 10.9.2.8.

10.9.2.10. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.9.2.11. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.9.2.12. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.9.2.13. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.10. Процедура выделения НК из образцов биопсийного материала (тканей).

Для вариантов исполнения «Complex» и «Tissue» набора «НК-сорбент».

10.10.1. Подготовка образцов к экстракции НК.

Для предварительной обработки образцов биопсийного материала (тканей) использовать «Комплект для лизиса тканей».

10.10.1.1. При первом использовании комплекта: приготовить раствор протеиназы К, для чего добавить 1 мл раствора для разведения протеиназы К в пробирку с сухой протеиназой К. Содержимое пробирки тщательно перемешать вортексированием до полного растворения протеиназы К.

Готовый раствор протеиназы К хранить при температуре -18...-20°C!

При повторном использовании комплекта: разморозить содержимое пробирки с раствором протеиназы К, раствор перемешать вортексированием, отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе.

10.10.1.2. В пробирки на 1,5 мл с образцами биоптата добавить по 100 мкл лизирующего раствора, по 10 мкл раствора протеиназы К и инкубировать, периодически встряхивая, при 55°C до полного растворения ткани.

Процесс занимает от 2 до 4 часов, при необходимости инкубацию можно проводить в течение ночи при 37° С.

10.10.1.3. Осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием на вортексе.

10.10.2. Экстракция НК.

Экстракцию НК из предварительно обработанных образцов тканей проводить с использованием комплектации «**Base**» набора **НК-сорбент**.

За 10-15 минут до начала работы растворы 1 и 2 (если они хранились при температуре +2...+8 градусов) перенести в комнатные условия для полного растворения кристаллов. При необходимости дополнительно прогреть при 60°C до полного растворения кристаллов.

10.10.2.1. Подготовить и промаркировать чистые пробирки на 1,5 мл по числу образцов.

10.10.2.2. В пробирки на 1,5 мл внести по 450 мкл раствора 1.

10.10.2.3. Внести в каждую пробирку по 100 мкл соответствующего образца биоптата, прошедшего обработку лизирующим раствором (п. 8.10.1.2-3).

10.10.2.4. Ресуспендировать сорбент на вортексе и добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента.

10.10.2.5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 минут при комнатной температуре.

10.10.2.6. Отцентрифугировать пробирки для сброса капель с крышки на вортексе. Внести в каждую пробирку по 200 мкл раствора 4 и перемешать на вортексе в течение 10 сек.

10.10.2.7. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.10.2.8. Добавить в пробирки по 400 мкл раствора 2. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.

10.10.2.9. Отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.10.2.10. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора 3. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.10.2.11. Повторить п. 10.10.2.10.

10.10.2.12. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора 4. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, отцентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс.об/мин в течение 30 секунд на микроцентрифуге и удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный аспиратор.

10.10.2.13. Оставить пробирки с открытыми крышками при комнатной температуре на 5 минут.

10.10.2.14. Добавить в пробирки по 100 мкл раствора для элюции и ресуспендировать сорбент с помощью вортекса.

10.10.2.15. Прогреть образцы в термостате при температуре 60°C в течение 5 минут, перемешать на вортексе и осадить сорбент на центрифуге при 13-14 тыс.об/мин в течение 2 минут.

Надосадочная жидкость содержит очищенную НК.

При постановке реакции амплификации следует не допускать попадания сорбента в реакционную смесь.

Полученный раствор НК можно хранить при температуре -18...-20°C в течение года.

10.11. Процедура оценки качества выделенной НК.

Для всех вариантов исполнения набора «НК-сорбент».

Оценка качества выделенных препаратов нуклеиновых кислот проводится непосредственно в ПЦР исследованиях и не требует проведения никаких дополнительных анализов, подтверждающих чистоту (качество очистки) препарата НК.

Для исследования выделенных проб НК рекомендуется использовать любые зарегистрированные ПЦР-наборы, предназначенные для диагностики инфекционных заболеваний и наследственных особенностей организма, и проводить анализ в соответствии с инструкцией к ПЦР-набору. При использовании ПЦР-наборов производства ООО НПФ «Литех» с детекцией результата в реальном времени, качество выделенной НК следует оценивать по результатам анализа внутреннего контроля (геномная ДНК человека). Сигнал выявления внутреннего контроля не должен превышать конечный цикл, указанный в инструкции к ПЦР-набору), в случае использования ЭВК при выделении образца конечный цикл не должен превышать 30.

В случае получения неудовлетворительных результатов оценки качества препарата НК (сигнал, соответствующий внутреннему контролю выявляется позже конечного цикла или не выявляется совсем) рекомендуется исключить ошибки на преаналитическом этапе исследования или на этапе забора материала, убедиться в использовании соответствующего клиническому образцу варианта исполнения набора и комплекта для предобработки материала, провести выделение образца в точном соответствии с инструкцией, провести обучение персонала по работе с набором с помощью специалистов ООО НПФ «Литех».

При соблюдении всех требований настоящей инструкции набор **НК-сорбент** позволяет получить препарат НК хорошего качества очистки (чистоты), достаточного для последующего проведения исследований методами ПЦР.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. Условия хранения

11.1.1. Все варианты исполнения набора реагентов **НК-сорбент** должны храниться при температуре плюс 2-8°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 12 месяцев.

11.1.2. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

11.2. Транспортирование

11.2.1. Набор реагентов **НК-сорбент** транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом, условия транспортирования соответствуют условиям хранения) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств.

11.2.2. Для всех вариантов исполнения набора **НК-сорбент** допустима транспортировка при температуре от плюс 18 до 25 °C в течение 5 дней (не более).

11.2.3. Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11.3. Эксплуатация набора

11.3.1. Набор реагентов **НК-сорбент** должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению.

11.3.2. Варианты исполнения «Complex», «Sputum», «Tissue» набора **НК-сорбент** содержат компоненты, предназначенные для предварительного приготовления растворов, непосредственно используемых при выделении НК:

- все реагенты «Комплекта для разжижения мокроты» предназначены для приготовления раствора NALC, используемого при проведении экстракции НК из образцов мокроты, плевральной жидкости, спермы. Приготовление раствора NALC проводить согласно действующей версии утверждённой инструкции. Раствор готовится в день использования и хранению не подлежит.

- реагенты «Комплекта для лизиса тканей» раствор для разведения протеиназы К и протеиназа К предназначены для приготовления раствора протеиназы К, используемого при проведении экстракции НК из образцов биопсийного материала (тканей). Приготовление раствора протеиназы К проводить согласно действующей версии утверждённой инструкции.

Готовый раствор протеиназы К хранить при температуре -18...-20°C в течение всего срока эксплуатации набора.

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

12. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клинико-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение НК) и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы).

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) /обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

13. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора **НК-сорбент** следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

Рук. производственно-технического центра
ООО НПФ «Литех»

Т.В.Парфенова

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



ПРОШНО
В КОЛИЧЕСТВЕ 28 ЛИСТОВ

№ 60-002/201-101

Тен. Директор
ООО «ВАИМПЕД-МЕДИЦИН»
Варнавичус 11.12.

Прошито, проверено,
скреплено печатью.
Количество листов

шт
Директор
Наумов А. Ю.

Копия верна
Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
шт.

Директор

Наумов А.Ю.





«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю.Наумов

2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для выявления и идентификации *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis*
методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени
ДИПЛЕКС Ng+Tv для диагностики *in vitro*»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ng+Tv** предназначен для одновременного выявления, идентификации и количественного определения ДНК *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, секрет предстательной железы, осадок мочи, отделяемое конъюнктивы, отделяемое слизистой ротоглотки).

Функциональное назначение – Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ng+Tv** предназначен для диагностики гонорейной и трихомонадной инфекции и определения бактериальной нагрузки.

Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ng+Tv** может быть использован в клинической лабораторной диагностике гонорейной и трихомонадной инфекции для выявления, идентификации и количественного определения возбудителей инфекций.

3. **ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА** - сотрудники клиничко-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **ДИПЛЕКС Ng+Tv** выпускается в 5 вариантах исполнения.

Варианты исполнения набора различаются степенью готовности реагентов к проведению анализа (**НЕРАСКАПАННЫЙ**, OneStep, TwoStep) (табл. 1).

Таблица 1

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	ДИПЛЕКС Ng+Tv-PB-120	1. Реакционная смесь PB 2. Taq-полимераза 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 50 мкл 2 пробирки по 2 мл 1 пробирка – 200 мкл
2	ДИПЛЕКС Ng+Tv-OneStep-PB-60	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. Разбавитель 3. ПКО ИППП	60 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 100 мкл



ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для выявления и идентификации *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis*
методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени
ДИПЛЕКС Ng+Tv для диагностики *in vitro*»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ng+Tv** предназначен для одновременного выявления, идентификации и количественного определения ДНК *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, секрет предстательной железы, осадок мочи, отделяемое конъюнктивы, отделяемое слизистой ротоглотки).

Функциональное назначение – Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ng+Tv** предназначен для диагностики гонорейной и трихомонадной инфекции и определения бактериальной нагрузки.

Набор предназначен для обследования всех групп населения любого возраста без градации по демографическому или популяционному признаку.

Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ng+Tv** может быть использован в клинической лабораторной диагностике гонорейной и трихомонадной инфекции для выявления, идентификации и количественного определения возбудителей инфекций.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА - сотрудники клинко-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **ДИПЛЕКС Ng+Tv** выпускается в 5 вариантах исполнения.

Варианты исполнения набора различаются степенью готовности реагентов к проведению анализа (НЕРАСКАПАННЫЙ, OneStep, TwoStep) (табл. 1).

Таблица 1

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	ДИПЛЕКС Ng+Tv-PB-120	1. Реакционная смесь PB 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 50 мкл 2 пробирки по 2 мл 1 пробирка – 200 мкл
2	ДИПЛЕКС Ng+Tv-OneStep-PB-60	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. Разбавитель 3. ПКО ИППП	60 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 100 мкл

3	ДИПЛЕКС Ng+Tv-OneStep-PB-96	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. Разбавитель 3. ПКО ИППП	96 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 100 мкл
4	ДИПЛЕКС Ng+Tv-TwoStep-PB-60	1. Реакционная смесь PB-TS 2. Раствор Taq-полимеразы 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	60 пробирок по 21 мкл 1 пробирка – 500 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 100 мкл
5	ДИПЛЕКС Ng+Tv-TwoStep-PB-96	1. Реакционная смесь PB-TS 2. Раствор Taq-полимеразы 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	96 пробирок по 21 мкл 1 пробирка – 800 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 100 мкл

Набор рассчитан на проведение анализа 60, 96 или 120 образцов, включая контрольные образцы, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты.

В состав реакционной (амплификационной) смеси входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (3 зонда): зонд для специфического фрагмента одного возбудителя содержит флуорофор FAM, зонд для специфического фрагмента второго возбудителя содержит флуорофор ROX, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX.
- праймеры для выявления внутреннего контроля (геномная ДНК человека); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения ДНК.

Амплификационная смесь комплектаций **OneStep** полностью готова к амплификации, содержит Taq-полимеразу;

Реакционная смесь комплектаций **TwoStep** требует внесения Taq-полимеразы, входящей в состав комплекта.

ПКО ИППП представляет собой количественно охарактеризованную смесь калибраторов (плазмиды со встроенной вставку специфических фрагментов геномов возбудителей ИППП и человека) в диапазоне $5 \times 10^6 - 5 \times 10^4$ ГЭ/мл. Во вкладыше к каждой серии набора реагентов указана точная концентрация соответствующего калибратора в образце ПКО ИППП, а также диапазон допустимых значений циклов пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (Ct) для ПКО ИППП на различных типах амплификаторов.

4.2. Комплектность

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- памятка по применению набора;
- вкладыш с данными ПКО.

Паспорт предоставляется по запросу пользователя.

Полная инструкция по применению представлена на сайте производителя www.lytech.ru (ГОСТ 51088). На бумажном носителе инструкция предоставляется по запросу пользователя.

4.3. Принцип метода

Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ng+Tv** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis* путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации

проводится в реакционном растворе. Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Cycle threshold, Ct). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце.

Возможность количественного определения ДНК *Neisseria gonorrhoeae* и ДНК *Trichomonas vaginalis* в режиме «реального времени» основывается на существовании зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (Ct).

В идеальном случае на каждом температурном цикле реакции количество нарабатываемой ДНК удваивается, т.е. количество продуктов реакции на цикле n равно начальному числу молекул, умноженному на 2^n :

$$N_n = N_0 2^n$$

где n – номер цикла реакции; N_0 – количество целевых молекул в начале реакции (на первом цикле); N_n – количество продуктов реакции на цикле n ; 2 – эффективность реакции (в оптимальных условиях эффективность ПЦР действительно близка к 2).

Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с положительным контрольным образцом с известной концентрацией ДНК-мишени.

Для сравнения графиков, полученных при проведении ПЦР «в реальном времени», используют один из двух основных подходов к анализу результатов: пороговый метод (определение значения порогового цикла реакции Ct, как точки пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии) или метод прямого сравнения графиков (определение значения некоторой точки C_p , crossing point, на графике накопления ДНК по форме кривой, например – метод максимума второй производной). Оба подхода предполагают нахождение некоторого значения на оси абсцисс (дробного значения цикла реакции), характеризующего данную кривую (найденное значение обычно обозначают как Ct в случае пороговых методов или C_p для методов, использующих анализ формы кривой). Полученные значения используют далее при сопоставлении результатов ПЦР для разных образцов. Суть порогового метода заключается в том, чтобы определить момент Ct (выраженный в циклах ПЦР), когда количество ДНК в реакционной пробирке (а, следовательно, и флуоресцентный сигнал) достигает одинаковой для всех образцов пороговой величины (задается пользователем или программным обеспечением). Сравнивая полученные значения Ct, можно судить о начальных концентрациях ДНК в исследуемых образцах. Чем меньше Ct, (т.е. чем быстрее количество ДНК в данном образце достигло пороговой величины), тем больше было в нем целевой ДНК в начальный момент времени. Зная пороговый цикл Ct для положительного контрольного образца (ПКО) с известной начальной концентрацией $C_{пко}$ можно вычислить относительную начальную концентрацию неизвестных образцов.

Формулы для расчета концентрации ДНК в анализируемом образце представлены в п. 11.3.

4.4. Метрологическая прослеживаемость значений концентрации калибраторов, входящих в состав ПКО ИППП, проведена до уровня контрольных образцов предприятия (калибраторы первого порядка), изготовленных из геномной ДНК *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis*. **Коммутабельность** контрольных образцов предприятия подтверждена результатами измерения концентрации ДНК референтной и рутинной методиками, предназначенными для измерения показателей концентрации при количественном исследовании ДНК, выделенной из соответствующих клинических образцов.

4.5. Ограничения метода

1) Метод ПЦР позволяет определять ДНК как в живых, так и в мертвых микроорганизмах. Поэтому ПЦР анализ клинических образцов следует проводить до начала антибиотикотерапии; в случае приема антибиотиков анализ проводится не раньше четырех - пяти недель после завершения курса лечения для определения эффективности терапии.

2) При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с ДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции, а также занижение реального содержания ДНК возбудителя в клиническом образце.

3) Вследствие того, что содержание криптолической плазмиды в клетке *Neisseria gonorrhoeae* может превышать 30 копий, количественная оценка наличия плазмидной ДНК не может полностью коррелировать с содержанием данного возбудителя в клиническом образце. По этой причине предлагаемый метод определения концентрации позволяет получить лишь оценочное представление о содержании *Neisseria gonorrhoeae* в клиническом образце.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана производителем при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *HSV 1 u 2 muna*, *CMV*, *HPV* (типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), а также геномной ДНК человека. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были. Специфичность, рассчитанная как % истинно отрицательных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

5.2. Аналитическая чувствительность

С помощью набора ДИПЛЕКС Ng+Tv можно обнаружить:

- 5×10^2 и более геном-эквивалентов/мл *Neisseria gonorrhoeae* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе;
- 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Trichomonas vaginalis* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе.

Ген-мишень для *Neisseria gonorrhoeae* находится на криптолической плазмиде, копияность которой составляет около 30 копий на 1 клетку, за 1 геном-эквивалент производителем набора реагентов принято значение 30.

5.3. Тест на прецизионность

Тест на прецизионность характеризуется рассеянием значений измеренных концентраций, получаемых при использовании набора относительно величины средней концентрации. Для образцов с концентрацией 10^5 геном-эквивалентов/мл для *Neisseria gonorrhoeae* и 2×10^5 геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* коэффициент вариации составляет не более 10%.

5.4. Тест на правильность определения концентрации

Тест на правильность определения – при детекции образцов с концентрациями 2×10^7 , 2×10^5 и 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* и 10^7 , 10^5 и 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Neisseria gonorrhoeae* процент отклонения измеренной концентрации от значения, принимаемого за истинное, находится в диапазоне 90-110%.

5.5. Диапазон линейности

Диапазон линейности – это диапазон концентраций, при детекции которых зависимость между значениями Ct и log концентрации удовлетворяет линейной модели. Модуль коэффициента корреляции для образцов с концентрациями 2×10^7 , 2×10^5 и 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* и 10^7 , 10^5 и 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Neisseria gonorrhoeae* составляет не менее 0,99. Таким образом, диапазон линейности составляет от 2×10^7 до 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* и от 10^7 до 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Neisseria gonorrhoeae*.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

6.1. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Neisseria gonorrhoeae*: 100 % (интервал 84,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Trichomonas vaginalis*: 100 % (интервал 94,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.2. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Neisseria gonorrhoeae*: 100 % (интервал 96,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Trichomonas vaginalis*: 100 % (интервал 97,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

6.3. Показана тождественность диагностических характеристик набора **ДИПЛЕКС Ng+Tv** на разных видах клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, осадок мочи, секрет предстательной железы, отделяемое конъюнктивы, отделяемое слизистой ротоглотки).

Таблица 2

Клинический материал	Количество образцов от пациентов	Микроорганизм	Результаты испытаний	
			Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	294	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	100% (95% ДИ: 95,4-100%)	100% (95% ДИ: 98,7-100%)
		<i>Trichomonas vaginalis</i>	100% (95% ДИ: 97,0-100%)	100% (95% ДИ: 98,5-100%)
Осадок мочи	172	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	100% (95% ДИ: 93,4-100%)	100% (95% ДИ: 97,7-100%)
		<i>Trichomonas vaginalis</i>	100% (95% ДИ: 94,6-100%)	100% (95% ДИ: 97,5-100%)
Секрет предстательной железы	168	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	100% (95% ДИ: 90,5-100%)	100% (95% ДИ: 97,9-100%)
		<i>Trichomonas vaginalis</i>	100% (95% ДИ: 95,1-100%)	100% (95% ДИ: 97,3-100%)
Отделяемое конъюнктивы	116	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	100% (95% ДИ: 88,3-100%)	100% (95% ДИ: 96,8-100%)
Отделяемое ротоглотки	104	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	100% (95% ДИ: 84,7-100%)	100% (95% ДИ: 96,6-100%)

6.4. Корреляция результатов

Показана высокая степень корреляции результатов измерения концентрации ДНК *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis*, полученных с помощью набора реагентов «ДИПЛЕКС Ng+Tv» и наборов реагентов сравнения «ДИПЛЕКС Ct+Ng», «ДИПЛЕКС Ct+Tv».

Разница между значениями концентрации ДНК *Neisseria gonorrhoeae* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, осадка мочи, секрета предстательной железы, отделяемого конъюнктивы, отделяемого слизистой ротоглотки не превышала 0,5 lg в 100% случаев.

Разница между значениями концентрации ДНК *Trichomonas vaginalis* в образцах отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, осадка мочи, секрета предстательной железы не превышала 0,5 lg в 100% случаев.

Рассчитанный коэффициент корреляции Спирмена составил не менее 0,98 ($p < 0,001$), что свидетельствует о значительном сходстве (эквивалентности) сравниваемых тест-систем.

6.5. Воспроизводимость результатов исследования с использованием набора **ДИПЛЕКС Ng+Tv** составляет 100% и подтверждена в ходе проведения клинических испытаний на заявленных термоциклах, разных сериях набора (внутрисерийная, межсерийная и внутрисерийная).

воспроизводимость). Коэффициент вариации измерения концентрации для одного и того же образца не превышает 10%.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 26

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует 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 реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III–IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

7.2.1. Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

7.2.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

7.2.3. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

7.2.4. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

7.2.5. Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсibilизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для всех вариантов исполнения набора

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5 - 50 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 10 и 100 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

Для комплектаций НЕРАСКАПАННЫЙ дополнительно:

- бесцветные одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 200 и до 1000 мкл.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1. Материал для исследования.

Материалом для исследования набором реагентов **ДИПЛЕКС Ng+Tv** являются образцы ДНК, выделенные из клинических проб (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, осадок мочи, секрет предстательной железы, отделяемое конъюнктивы и слизистой ротоглотки (только для определения ДНК *N.gonorrhoeae*).

9.2. Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Взятие материала осуществляется одноразовым стерильным зондом.

За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры. Присутствие в исследуемом материале большого количества слизи и примеси крови могут привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам.

Особенности взятия материала из уретры.

- перед взятием материала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5 – 2 часов;
- непосредственно перед взятием материала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором;
- при наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 минут после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия материала;
 - у женщин перед введением зонда в уретру проводится ее массаж о лобковое сочленение;
 - в уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0 – 1,5 см, у мужчин – на 3 – 4 см и затем совершается несколько вращательных движений; у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия материала из цервикального канала.

- перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;
- зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5 – 1,5 см;
- при наличии эрозий цервикального канала необходимо их обработать стерильным физиологическим раствором, и материал следует брать на границе здоровой и измененной ткани;
- при извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание со стенками влагалища.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия материала с конъюнктивы глаз.

При наличии обильного гнойного отделяемого его убирают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

Соскоб берут с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. При взятии соскоба необходимо придерживать веко руками, чтобы при моргании ресницы не касались зонда.

Особенности взятия материала с задней стенки глотки.

Одноразовый зонд вводят за мягкое небо в носоглотку и проводят по задней стенке глотки.

Особенности взятия секрета предстательной железы.

Перед взятием секрета простаты головка полового члена обрабатывается стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором. Секрет простаты берется после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к вершечке. Затем из кавернозной части выдавливается простатический секрет, который собирается в стерильную емкость (сосуды с широким горлом, пробирки). После взятия секрета простаты он должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов. Транспортировка биологического материала должна производиться только в сумке-холодильнике.

Особенности взятия (сбора) мочи.

Мочу собирают утром натощак после сна или не ранее чем через 2-3 часа после последнего мочеиспускания.

При сборе мочи желательно использовать специальный контейнер для сбора мочи. Минимальный объем мочи необходимый для проведения анализа составляет 20 мл.

Если в лабораторию доставляется не вся собранная моча, то перед тем, как часть мочи сливается в посуду для транспортировки, ее необходимо тщательно взболтать.

Собранную мочу доставляют в лабораторию в течение 1-3 часов без дополнительного охлаждения. Длительное хранение мочи при комнатной температуре до исследования приводит к изменению не только ее физических свойств и к разрушению клеток, но и к размножению бактерий.

9.3. Предварительная обработка клинического материала

Обработка клинического материала для выделения ДНК, а также его хранение производится согласно инструкции производителя набора для выделения ДНК из клинического материала.

Для подготовки образцов ДНК могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ реагенты, предназначенные для выделения нуклеиновых кислот (ДНК) из клинического материала (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, отделяемое конъюнктивы, отделяемое слизистой ротоглотки, осадок мочи, секрет предстательной железы) для ПЦР-диагностики. Производитель рекомендует использовать зарегистрированный в установленном

порядке набор «НК-сорбент» (ООО НПФ «Литех», РЗН 2019/9331) совместно с набором ДИПЛЕКС Ng+Tv для полного цикла исследования образцов.

9.4. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Материалом для исследования набором реагентов ДИПЛЕКС Ng+Tv являются образцы ДНК, выделенные из клинических проб.

Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов ДИПЛЕКС Ng+Tv могут являться:

- использование непредусмотренных для данного изделия видов анализируемого биологического материала или наборов для пробоподготовки (выделение ДНК);
- использование для проведения ПЦР-исследования образцов ДНК, содержащих избыточное количество НК, в первую очередь, геномной ДНК человека в концентрации более 100 мкг/мл;
- эндогенные интерферирующие вещества, входящие в состав клинического материала (например, избыточное количество примесей в виде слизи, крови, гноя в образцах отделяемого слизистых оболочек, мочи, секрета предстательной железы), приводящие к получению недостаточно очищенного препарата ДНК в результате неэффективной экстракции наборами для пробоподготовки; такие образцы должны быть отбракованы на преаналитическом этапе анализа и не подвергаться дальнейшему исследованию;
- экзогенные интерферирующие вещества (например, избыточное количество примесей в виде жиров в составе лекарственных препаратов местного действия - мазей, вагинальных свечей).

При использовании зарегистрированного в установленном порядке набора реагентов для выделения ДНК «НК-сорбент» (РУ № РЗН 2019/9331) интерференции не ожидается.

Производителем Набора реагентов НК-сорбент было показано сохранение эффективности выделения НК из клеток в случае присутствия в клинических образцах потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы, и превышающих их в несколько раз.

Таблица 3

образец	интерферент	допустимое содержание в образце
отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	кровь	10%
	слизь	20%
	гной	25%
	жиры	30%
отделяемое носоглотки и конъюнктивы	кровь	10%
моча	гемоглобин	7,5 мг/л
секрет предстательной железы	кровь	10%

Все это может приводить к ингибированию реакции амплификации, снижению чувствительности анализа и получению ложноотрицательных результатов. Для контроля качества тестируемой ДНК и присутствия возможных ингибиторов в наборе реагентов ДИПЛЕКС Ng+Tv предусмотрено тестирование внутреннего контрольного образца (ВКО) с помощью специальных праймеров, входящих в состав реакционной (амплификационной) смеси (см. п. 4.1 Инструкции). По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО, говорит о хорошем качестве тестируемого образца нуклеиновых кислот. Отсутствие сигнала ВКО после проведения ПЦР свидетельствует о ненадлежащем качестве образца для исследования и требует повторной пробоподготовки.

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

10.1. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения ДИПЛЕКС Ng+Tv-РВ-120.

10.1.1. Приготовить необходимое число бесцветных пробирок вместимостью 0,2 мл, включая пробирки для ПКО ИППП и отрицательного контрольного образца.

Маркировка пробирок на крышке возможна только для реал-тайм амплификатора Rotor-Gene, для всех остальных амплификаторов маркировка пробирок на крышке недопустима! В таком случае пробирки следует расставить в соответствии с заранее подготовленной схемой.

10.1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционной смесью РВ и разбавителем тщательно перемешать.

10.1.3. Из компонентов набора приготовить смесь из расчета на 1 образец (табл.4):

Таблица 4

Компонент	Количество (мкл)
Разбавитель	21
Реакционная смесь РВ	7
Taq-полимераза	0,3

Рекомендуется готовить смесь реагентов не менее чем на 5 реакций. При приготовлении смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

10.1.4. Перемешать амплификационную смесь пипетированием или импульсным вортиксованием в течение 10 секунд.

10.1.5. Внести в приготовленные пробирки по 28 мкл полученной амплификационной смеси.

Перейти к пункту 10.4.

10.2. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения ДИПЛЕКС Ng+Tv-TwoStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ng+Tv-TwoStep-PB-96.

10.2.1. Достать набор из холодильника, подготовить и пронумеровать необходимое количество пробирок с реакционной смесью РВ-TS, включая пробирки для ПКО ИППП и отрицательного контрольного образца.

10.2.2. Пробирку с Раствором Taq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортиксованием в течение 10 секунд.

10.2.3. Добавить во все пробирки по 7 мкл Раствора Taq-полимеразы.

Перейти к пункту 10.4.

10.3. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения ДИПЛЕКС Ng+Tv-OneStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ng+Tv-OneStep-PB-96

Данная комплектация не требует предварительной подготовки реагентов и представляет собой полностью готовую амплификационную смесь РВ-OS, содержащую Taq-полимеразу и расфасованную в пробирки для проведения реакции.

10.3.1. Достать из коробки и промаркировать необходимое число пробирок, включая пробирки для ПКО ИППП и отрицательного контрольного образца.

10.3.2. Полностью разморозить содержимое пробирок.

При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5 сек. на микроцентрифуге-вортексе.

10.4. Проведение амплификации, все варианты комплектаций.

10.4.1. В пробирки с амплификационной смесью добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 7 мкл:

- а) в пробирку отрицательного контрольного образца (ОКО) – разбавитель;
- б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в) в пробирку положительного контрольного образца (ПКО) – ПКО ИППП.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

10.4.2. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

10.4.3. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующим программам (ниже представлены программы амплификации для комплектаций TwoStep для различных видов амплификаторов):

«CFX 96» (BioRad)

«Rotor-Gene Q» (QIAGEN)

+80 °C	2 мин*	
+95 °C	1 мин 30 сек	
+95 °C	15 сек	40 циклов
+60 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX)	
+72 °C	40 сек	

«iCycler IQ5» (BioRad)

«ДТ-96» (ДНК-Технология)

+80 °C	2 мин*	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	40 циклов
+62 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX)	
+72 °C	20 сек	

* - для комплектаций НЕРАСКАПАННЫЙ и OneStep раздел программы +80 °C -2 мин необязателен.

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора (www.lytech.ru).

11. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Детекция результатов

При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов ДИПЛЕКС Ng+Tv представлены в таблице 5 на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» ДТ-96 (ДНК-технология, Россия).

Таблица 5

Флуорофор	Возбудитель	Пороговая линия	Конечный цикл (КЦ)
HEX	ДНК человека	20	35
FAM	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	100	35
ROX	<i>Trichomonas vaginalis</i>	20	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца (значение N/A или НД) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла (КЦ). Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

11.2. Интерпретация результатов

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 6.

11.3. Расчет концентрации ДНК в анализируемом образце

Внимание! Надежными можно считать концентрации только тех образцов, значения C_t для которых лежат в указанном диапазоне линейности.

Рассчитать концентрацию ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* и – при необходимости – ДНК человека в образце по формуле:

$$C_{\text{образца}} = C_{\text{КО}} * 2^{(C_{t\text{КО}} - C_{t\text{образца}})}$$

$C_{\text{образца}}$ – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце, выраженная в геном-эквивалентах/мл,

$C_{\text{КО}}$ – концентрация соответствующего калибратора в ПКО ИППП, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору),

$C_{t\text{образца}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$C_{t\text{КО}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции соответствующего калибратора с пороговой линией.

Таблица 6

	Ct FAM	Ct ROX	Ct HEX	Результат
ПКО ИППП	22-28*	22-28*	22-28*	Реакция прошла
	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
ОКО	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	< КЦ	< КЦ	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ .
Исследуемый образец	< КЦ	< КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ ДНК двух возбудителя.
	< КЦ	НЗ или > КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	НЗ или > КЦ	< КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i>
	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.
	НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	> КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

* точный диапазон значений указан во вкладыше к набору реагентов.

Концентрация ДНК возбудителя может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. При этом концентрация ДНК *Neisseria gonorrhoeae* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК } N. \text{gon.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000 ,$$

концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\Gamma\Xi/\text{мл}} \text{ ДНК } Trich.vag.}{C_{\Gamma\Xi/\text{мл}} \text{ ДНК человека}} * 100000,$$

$C_{\Gamma\Xi/\text{мл}}$ ДНК *N.gon.* - вычисленная концентрация ДНК *Neisseria gonorrhoeae* в образце

$C_{\Gamma\Xi/\text{мл}}$ ДНК *Trich.vag* - вычисленная концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* в образце

$C_{\Gamma\Xi/\text{мл}}$ ДНК человека - вычисленная концентрация ДНК человека в образце.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор ДИПЛЕКС Ng+Tv-PB-120 должен храниться при температуре -18...-20 °С в течение всего срока годности. Срок годности набора – 12 месяцев.

Наборы ДИПЛЕКС Ng+Tv-TwoStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ng+Tv-TwoStep-PB-96 должны храниться при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности. Срок годности наборов – 9 месяцев.

Наборы ДИПЛЕКС Ng+Tv-OneStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ng+Tv-OneStep-PB-96 должны храниться при температуре -18...-20 °С в течение всего срока годности. Срок годности наборов – 4 месяца.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

12.2. Транспортирование

Набор реагентов ДИПЛЕКС Ng+Tv транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом (условия транспортирования соответствуют условиям хранения) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств.

Для набора реагентов ДИПЛЕКС Ng+Tv-PB-120 допустима транспортировка при температуре +2...+8 °С в течение 5 дней (не более).

Для наборов реагентов ДИПЛЕКС Ng+Tv-TwoStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ng+Tv-TwoStep-PB-96 допустима транспортировка при температуре +18...+25 °С в течение 3 дней (не более).

Для наборов реагентов ДИПЛЕКС Ng+Tv-OneStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ng+Tv-OneStep-PB-96 допустима транспортировка при температуре +2...+8 °С в течение 1 суток (не более), либо в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

13. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАБОРА

Предприятие-изготовитель проводит приемочные испытания для каждой производственной серии, осуществляя верификационный контроль основных аналитических характеристик (технические характеристики), внешний вид, комплектность, упаковку, маркировку, а также контроль качества сырья и компонентов.

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контроля качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК выявляемых микроорганизмов (например, панели ФСВОК).

14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 1.2.3685-21.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клинико-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение ДНК) и отходы после проведения амплификации подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора ДИПЛЕКС Ng+Tv, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 14 ЛИСТОВ

«20» 04 2024 год



Ген. Директор
ООО «ВЫМЛЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Д.К.

Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
14 шт.



Директор
Наумов А.Ю.

4. Количественная оценка результатов анализа.

При количественной оценке значение C_t (цикл пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией) исследуемого образца сравнивается со значением C_t ПКО (положительного контрольного образца) с известной концентрацией. Концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* и – при необходимости – ДНК человека в образце вычисляется по формуле:

$$C_{\text{образца}} = C_{\text{КО}} * 2^{(C_{t\text{КО}} - C_{t\text{образца}})}$$

$C_{\text{образца}}$ – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце, выраженная в геном-эквивалентах/мл,

$C_{\text{КО}}$ – концентрация соответствующего калибратора в ПКО ИППП, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору),

$C_{t\text{образца}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$C_{t\text{КО}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции соответствующего калибратора в составе ПКО ИППП с пороговой линией.

Концентрация ДНК возбудителя может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. При этом концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{гэ/мл ДНК Trich.vag.}}}{C_{\text{гэ/мл ДНК человека}}} * 100000$$

концентрация ДНК *Neisseria gonorrhoeae* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{гэ/мл ДНК N.gon.}}}{C_{\text{гэ/мл ДНК человека}}} * 100000$$

$C_{\text{гэ/мл ДНК Trich.vag.}}$ – вычисленная концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* в образце,

$C_{\text{гэ/мл ДНК N.gon.}}$ – вычисленная концентрация ДНК *Neisseria gonorrhoeae* в образце,

$C_{\text{гэ/мл ДНК человека}}$ – вычисленная концентрация ДНК человека в образце.

С помощью набора ДИПЛЕКС Ng+Tv можно обнаружить:

- 1000 и более геном-эквивалентов/мл *Trichomonas vaginalis* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе;

- 500 и более геном-эквивалентов/мл *Neisseria gonorrhoeae* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе.

Диапазон линейности составляет от 2×10^7 до 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* и от 1×10^7 до 1×10^3 геном-эквивалентов/мл для *Neisseria gonorrhoeae*.

По всем вопросам обращайтесь в офис компании ООО НПФ «Литех»:

многоканальный телефон (495) 258-39-47, e-mail: info@lytech.ru

119435, Москва, ул. Малая Пироговская, дом 1, строение 3



ПАМЯТКА

по применению набора реагентов для выявления и идентификации *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени ДИПЛЕКС Ng+Tv для диагностики *in vitro*

Набор реагентов ДИПЛЕКС Ng+Tv предназначен для одновременного выявления, идентификации и количественного определения ДНК *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, секрет предстательной железы, осадок мочи, отделяемое конъюнктивы, отделяемое слизистой ротоглотки).

1. Подготовка к проведению амплификации.

Маркировка пробирок на крышке возможна только для реал-тайм амплификатора Rotor-Gene Q, для всех остальных амплификаторов маркировка пробирок на крышке недопустима! В таком случае пробирки следует расставить в соответствии с заранее подготовленной схемой.

1.1. Вариант исполнения PB-120 («Нераскапанный»).

1.1.1. Приготовить и промаркировать необходимое число бесцветных пробирок вместимостью 0,2 мл, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

1.1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционной смесью и разбавителем тщательно перемешать.

1.1.3. Из компонентов набора приготовить амплификационную смесь из расчета на 1 пробу:

Компонент	Количество (мкл)
Разбавитель	21
Реакционная смесь	7
Тaq-полимераза	0,3

Рекомендуется готовить смесь реагентов не менее чем на 5 реакций. При приготовлении смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

1.1.4. Перемешать амплификационную смесь пипетированием или импульсным вортиксованием в течение 10 секунд.

1.1.5. Внести в приготовленные пробирки по 28 мкл полученной амплификационной смеси. Перейти к пункту 2.

1.2. Варианты исполнения TwoStep-PB-60, TwoStep-PB-96.

1.2.1. Достать из коробки и промаркировать необходимое количество пробирок с реакционной смесью, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

1.2.2. Пробирку с Раствором Таq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортиксованием в течение 10 секунд.

1.2.3. Добавить во все пробирки по 7 мкл Таq-полимеразы. Перейти к пункту 2.

1.3. Варианты исполнения OneStep-PB-60, OneStep-PB-96

Данная комплектация не требует предварительной подготовки реагентов и представляет собой полностью готовую амплификационную смесь, содержащую Таq-полимеразу и расфасованную в пробирки для проведения реакции.

1.3.1. Достать из коробки и промаркировать необходимое число пробирок, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

1.3.2. Полностью разморозить содержимое пробирок.

При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5 сек. на микроцентрифуге-вортексе.

Перейти к пункту 2.

2. Проведение амплификации, все комплектации.

2.1. В пробирки с амплификационной смесью добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 7 мкл:

- а) в пробирку отрицательного контрольного образца (ОКО) – разбавитель;
- б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в) в пробирку положительного контрольного образца – ПКО ИППП.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

2.2. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

2.3. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующим программам (ниже представлены программы амплификации для комплектаций «TwoStep» для различных видов амплификаторов):

Для работы с наборами ДИПЛЕКС используются каналы FAM, HEX и ROX (Green, Yellow и Orange).

«CFX 96» (BioRad)
«Rotor-Gene Q» (Qiagen)

+80 °C	2 мин*	
+95 °C	1 мин 30 сек	
+95 °C	15 сек	
+60 °C	30 сек (считывание)**	40 циклов
+72 °C	40 сек	

«iCycler IQ5» (BioRad)
«DT-96» (ДНК-Технология)

+80 °C	2 мин*	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	
+62 °C	30 сек (считывание)**	40 циклов
+72 °C	20 сек	

* - для комплектаций «Нераскапанный» и «OneStep» раздел программы +80 °C - 2 мин необязателен.

** - Детекция ДНК *Neisseria gonorrhoeae* осуществляется по каналу FAM (Green), детекция ДНК *Trichomonas vaginalis* – по каналу ROX (Orange), внутреннего контроля (ДНК человека) – по каналу HEX (Yellow).

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора (www.lytech.ru).

3. Анализ и интерпретация результата.

После завершения программы амплификации применить следующие настройки:

Амплификатор	Параметр	Канал флуоресценции		
		FAM (Green)	HEX (Yellow)	ROX (Orange)
IQ5 (Bio-Rad)	Baseline threshold	60	80	30
CFX96 (Bio-Rad)	Analyze Data from Cycle 5 to 40 Baseline Setting – Apply Fluorescence Drift Correction			
	Baseline threshold	40	30	30
Rotor Gene Q (Qiagen)	Dynamic Tube	ON	ON	ON
	Slope correct	ON	ON	ON
	Ignore first	5	5	5
	Baseline threshold	0,06	0,03	0,03
	Outer removal	10%	15%	10%
	Eliminate cycles before	10	10	10
ДТ96 (ДНК-технология)	Baseline threshold	100	20	20
	Критерий положительного результата ПЦР	90%	90%	90%

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца означает, что пересечения кривой накопления с пороговой линией не произошло (НЗ). Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла (Для данного набора реагентов равен 35). Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

	Ct FAM (Green)	Ct ROX (Orange)	Ct HEX (Yellow)	Результат
ПКО ИППП	Указано во вкладыше			Реакция прошла
	Не соответствует вкладышу			Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
ОКО	НЗ или > 35	НЗ или > 35	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	< 35	< 35	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или > 35	НЗ или > 35	< 35	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
Исследуемый образец	< 35	< 35	< 35	ПРИСУТСТВИЕ ДНК обоих возбудителей.
	< 35	НЗ или > 35	< 35	ПРИСУТСТВИЕ ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	НЗ или > 35	< 35	< 35	ПРИСУТСТВИЕ ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i>
	НЗ или > 35	НЗ или > 35	< 35	ОТСУТСТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.
	НЗ или > 35	НЗ или > 35	> 35	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.