

КОПИЯ
ВЕРНА



ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР

А. Н. ТОРОПОВСКИЙ

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ТестГен»

А. Н. Тороповский

«20» июля 2021 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для одновременного качественного
выявления ДНК**

***Chlamydia trachomatis, Mycoplasma genitalium,
Neisseria gonorrhoeae, Ureaplasma urealyticum,
Trichomonas vaginalis***

**методом мультиплексной полимеразной цепной
реакции в реальном времени
«UROGEN-Тест-5»**

ТУ 21.20.23-014-97638376-2019

Содержание

Введение.....	3
1. Назначение.....	5
2. Принцип метода	7
3. Состав набора реагентов	10
4. Характеристики набора реагентов	13
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «UROGEN-Тест-5»	16
6. Меры предосторожности при работе с набором.....	17
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором.....	20
8. Анализируемые образцы	21
9. Проведение анализа	25
10. Регистрация и интерпретация результатов.....	28
11. Информация о стабильности медицинского изделия.....	32
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора.....	32
13. Утилизация	34
14. Гарантийные обязательства, контакты	35
Приложение А.....	36

Введение

Инфекционные заболевания урогенитального тракта являются одной из причин снижения качества жизни и нарушения репродуктивной функции человека. Своевременная диагностика урогенитальных инфекций способствует сокращению уровня заболеваемости благодаря эффективной лекарственной терапии, что улучшает качество жизни.

Целевым анализом, выявляемым при помощи набора реагентов «UROGEN-Тест-5», являются специфичные участки геномной ДНК микроорганизмов *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*.

Материалом для проведения исследования служат пробы ДНК, выделенные из биологического материала больного – мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб из цервикального канала, соскоб из уретры, клеточный осадок первой порции свободно выпущенной мочи, секрет предстательной железы (при наличии показаний).¹

Научная обоснованность целевого анализа заключается в его специфичности (уникальности последовательности ДНК) в отношении геномов микроорганизмов *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*.

Chlamydia trachomatis – неподвижные грамотрицательные бактерии, являющиеся облигатными внутриклеточными паразитами эукариотических клеток, принадлежат к семейству Chlamydiaceae. Обладают тропизмом к цилиндрическому эпителию и способны поражать слизистую оболочку уретры, цервикального канала, прямой кишки, ротоглотки и конъюнктивы глаз.²

Trichomonas vaginalis – одноклеточный микроорганизм, относится к типу простейших, семейству Trichomonadidae, облигатный паразит, получающий важнейшие питательные

компоненты из секрета половых путей путём фагоцитоза эпителиоцитов, и симбиотных микроорганизмов³.

Mycoplasma genitalium и *Ureaplasma urealyticum* – условно-патогенные микроорганизмы, которые способны вызывать уретрит, цервицит, цистит, воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), а также осложнения течения беременности, послеродовые и послеабортные осложнения⁴.

Neisseria gonorrhoeae – грамотрицательный диплококк бобовидной формы, относится к семейству Neisseriaceae. Приводит к развитию инфильтративных и дегенеративных процессов слизистой оболочки органов урогенитальной и репродуктивной систем, прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы⁵.

Инфицирование урогенитальными инфекциями взрослых лиц происходит при половом контакте с больным, детей – интранатальным путем и при половом контакте; в исключительных случаях девочки младшего возраста могут инфицироваться при нарушении правил личной гигиены и ухода за детьми.

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, инфекционная диагностика.

Показания и противопоказания к применению

Выявление ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* методом мультиплексной ПЦР в реальном времени рекомендуется у пациентов с клиническими и/или лабораторными признаками воспалительного процесса органов урогенитального тракта и репродуктивной системы; при предгравидарном обследовании; при обследовании женщин во время беременности (троекратно: при постановке на учёт по поводу беременности, при сроке беременности 27-30 недель и 36-40 недель); беременным, поступающим на роды без документов о результатах обследования на ИППП; при предстоящих оперативных (инвазивных) манипуляциях на половых органах и

¹ Клинические рекомендации: Ведение больных инфекциями, передаваемых половым путем и урогенитальными инфекциями. Российское общество дерматовенерологов и косметологов. М. Деловой экспресс. - 2012 г.

² Клинические рекомендации: Хламидийная инфекция. Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2016 г.

³ Клинические рекомендации: Урогенитальный трихомониаз. Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2016 г.

⁴ Клинические рекомендации: Урогенитальные заболевания, вызванные *Ureaplasma* spp., *M. Hominis*. Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2016 г.

⁵ Клинические рекомендации: Гонококковая инфекция. Министерство здравоохранения Российской Федерации 2016 г.

органах малого таза; лицам с перинатальными потерями и бесплодием в анамнезе; половым партнёрам больных ИППП; лицам декретированных профессий (в соответствии с регламентирующими документами); лицам, перенёвшим сексуальное насилие.

Применяемый способ исследования ДНК относится к неинвазивным процедурам, не несёт угрозы здоровью человека и не вызывает осложнений.

Противопоказаний к применению нет.

1. Назначение

1.1. Назначение: набор реагентов «UROGEN-Тест-5» предназначен для качественного выявления специфичных участков геномной ДНК микроорганизмов *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* методом мультиплексной аллель-специфической полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах ДНК с целью диагностики наличия урогенитальной инфекции у пациентов с клиническими и/или лабораторными признаками воспалительного процесса органов урогенитального тракта и репродуктивной системы; при предгравидарном обследовании; при обследовании женщин во время беременности (троекратно: при постановке на учёт по поводу беременности, при сроке беременности 27-30 недель и 36-40 недель); беременным, поступающим на роды без документов о результатах обследования на ИППП; при предстоящих оперативных (инвазивных) манипуляциях на половых органах и органах малого таза; лицам с перинатальными потерями и бесплодием в анамнезе; половым партнёрам больных ИППП; лицам декретированных профессий (в соответствии с регламентирующими документами); лицам, перенёвшим сексуальное насилие¹⁻⁵.

Биологическим материалом для исследования являются:

- мазки со слизистой оболочки влагалища,
- соскоб из цервикального канала,
- соскоб из уретры,
- клеточный осадок первой порции свободно выпущенной мочи,
- секрет предстательной железы.

1.2. Количество реакций

Набор реагентов «UROGEN-Тест-5» представлен в четырёх формах комплектации:

1. «UROGEN-Тест-5-96» для проведения 96 реакций каждого мультиплекса (MU – *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*; TN – *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*; Chl – *Chlamydia trachomatis*), что соответствует определению 90 исследуемых образцов, отрицательных и положительных образцов при трёх единичных запусках амплификатора на 96 лунок или 32 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

2. «UROGEN-Тест-5-MU» для проведения 96 реакций с мультиплексом MU (*Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*), что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательных и положительных образцов при одновременной постановке в амплификаторе на 96 лунок или 32 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

3. «UROGEN-Тест-5-TN» для проведения 96 реакций с мультиплексом TN (*Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*), что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательных и положительных образцов при одновременной постановке в амплификаторе на 96 лунок или 32 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

4. «UROGEN-Тест-5-Chl» для проведения 96 реакций с мультиплексом Chl (*Chlamydia trachomatis*), что соответствует определению 94 исследуемых образцов, отрицательных и положительных образцов при одновременной постановке в амплификаторе на 96 лунок или 32 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

1.3. Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика, инфекционная диагностика.

1.4. Требования к квалификации пользователей: для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях. Профессиональный

уровень потенциальных потребителей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

1.5. Функциональное назначение. Полученные результаты могут использоваться для диагностики урогенитальных инфекций, вызванных *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*.

1.6. Показания к применению

Выявление ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* методом мультиплексной ПЦР в реальном времени рекомендуется у пациентов с клиническими и/или лабораторными признаками воспалительного процесса органов урогенитального тракта и репродуктивной системы; при предгравидарном обследовании; при обследовании женщин во время беременности (троекратно: при постановке на учёт по поводу беременности, при сроке беременности 27-30 недель и 36-40 недель); беременным, поступающим на роды без документов о результатах обследования на ИППП; при предстоящих оперативных (инвазивных) манипуляциях на половых органах и органах малого таза; лицам с перинатальными потерями и бесплодием в анамнезе; половым партнёрам больных ИППП; лицам декретированных профессий (в соответствии с регламентирующими документами); лицам, перенёвшим сексуальное насилие¹⁻⁵.

1.7. Демографические и популяционные аспекты применения: без ограничений

1.8. Противопоказаний к применению нет.

1.9. Стерильность: изделие не стерильно.

2. Принцип метода

Метод

Мультиплексная аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Тип анализируемого образца

Биологическим материалом для исследования являются:

- мазки со слизистой оболочки влагалища,
- соскоб из цервикального канала,
- соскоб из уретры.

- клеточный осадок первой порции свободно выпущенной мочи,
- секрет предстательной железы.

Принцип определения

Качественное выявление ДНК микроорганизмов *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* методом мультиплексной аллель-специфической ПЦР в реальном времени в пробе ДНК, выделённой из биологического материала, включает в себя три этапа:

1. Подготовку ПЦР;
2. ПЦР-амплификацию ДНК и гибридационно-флуоресцентную детекцию продуктов амплификации в режиме реального времени;
3. Интерпретацию результатов.

С пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков генов при помощи специфичных к этим участкам ДНК праймеров в реакционном буфере.

В состав ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», dNTP, урацил-ДНК-гликозидазу и оптимизированный буфер. Наличие фермента урацил-ДНК-гликозидазы препятствует получению ложноположительных результатов при контаминации продуктами амплификации, при этом фермент полностью инактивируется в процессе первого цикла денатурации ДНК и не препятствует амплификации продуктов текущей реакции.

В составе праймер-микса присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушителем, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путём измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичных участков ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, а также специфичного фрагмента гена *COMT* человека (для контроля взятия материала, далее – KBM) (табл. 1).

Таблица 1 – Состав мультиплексов, входящих в набор

Мультиплекс (праймер-микс)	Канал, соответствующий флуорофору		
	FAM/Green	ROX/Orange	HEX/Yellow
MU	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	KBM (ген <i>COMT</i> человека)
TN	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	KBM (ген <i>COMT</i> человека)
Chl	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	KBM (ген <i>COMT</i> человека)

KBM позволяет подтвердить факт взятия материала от человека, оценить качество, эффективность выделения ДНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Ограничения метода

Возможная причина получения ложноположительного результата - контаминация на этапе выделения ДНК либо проведения реакции мультиплексной ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Нарушение целостности упаковки при транспортировании.

Использование набора с истёкшим сроком годности или нарушение условий хранения набора.

Нарушение условий хранения при транспортировании образцов.

Время проведения реакции мультиплексной ПЦР составляет 60 мин. (без учета пробоподготовки).

3. Состав набора реагентов

Форма комплектации

Набор реагентов «UROGEN-Тест-5» выпускается в четырёх формах комплектации:

1. «UROGEN-Тест-5-96» для проведения 96 реакций каждого мультиплекса (MU – *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*; TN – *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*; Chl – *Chlamydia trachomatis*),

2. «UROGEN-Тест-5-MU» для проведения 96 реакций с мультиплексом MU (*Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*),

3. «UROGEN-Тест-5-TN» для проведения 96 реакций с мультиплексом TN (*Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*),

4. «UROGEN-Тест-5-Chl» для проведения 96 реакций с мультиплексом Chl (*Chlamydia trachomatis*).

Состав набора

Таблица 2 – Состав формы комплектации «UROGEN-Тест-5-96»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1 152 мкл
2	Праймер-микс MU 2х	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 960 мкл
3	Праймер-микс TN 2х	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 960 мкл
4	Праймер-микс Chl 2х	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 960 мкл
5	Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 540 мкл
6	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 1 500 мкл

Таблица 3 – Состав формы комплектации «UROGEN-Тест-5-MU»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объём
1	ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 384 мкл
2	Праймер-микс MU 2х	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 960 мкл

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
3	Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 192 мкл
4	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 500 мкл

Таблица 4 – Состав формы комплектации «UROGEN-Тест-5-TN»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 384 мкл
2	Праймер-микс TN 2х	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 960 мкл
3	Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 192 мкл
4	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 500 мкл

Таблица 5 – Состав формы комплектации «UROGEN-Тест-5-Chl»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 384 мкл
2	Праймер-микс Chl 2х	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 960 мкл
3	Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 192 мкл
4	Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 500 мкл

ПЦР-буфер готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты, урацил-ДНК-гликозидазу и оптимизированный буфер.

Праймер-микс MU готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к специфичному участку геномной ДНК *Mycoplasma genitalium*. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к специфичному участку геномной ДНК *Ureaplasma urealyticum*. Детекция осуществляется по каналу ROX/Orange.
3. Праймеры и зонд к KBM. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс TN готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к специфичному участку геномной ДНК *Trichomonas vaginalis*. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к специфичному участку геномной ДНК *Neisseria gonorrhoeae*. Детекция осуществляется по каналу ROX/Orange.
3. Праймеры и зонд к KBM. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Праймер-микс Chl готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к специфичному участку геномной ДНК *Chlamydia trachomatis*. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.
2. Праймеры и зонд к KBM. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

Прохождение реакции по HEX/Yellow Ct_≤32 говорит о достаточном качестве забора материала, эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР. При отсутствии реакции по каналу HEX/Yellow или Ct_>32 и одновременном отсутствии реакции по каналам спецификации FAM/Green и ROX/Orange, результат следует считать невалидным, для данного исследуемого образца провести повторное исследование, начиная с выделения ДНК. В случае повторения невалидного результата, заново произвести забор биоматериала у данного пациента.

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК:

участок гена *COMT* человека, специфичные фрагменты ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1 Технические и функциональные характеристики

Таблица 6 – Набор реагентов «UROGEN-Тест-5»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1 Внешний вид	
1.1.1 Форма комплектации «UROGEN-Тест-5-96» для проведения 96 реакций каждого мультиплекса (MU – <i>Mycoplasma genitalium</i>, <i>Ureaplasma urealyticum</i>; TN – <i>Trichomonas vaginalis</i>, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>; Chl – <i>Chlamydia trachomatis</i>)	
ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость
Праймер-микс MU	Прозрачная жидкость сиреневого цвета
Праймер-микс TN	Прозрачная жидкость сиреневого цвета
Праймер-микс Chl	Прозрачная жидкость сиреневого цвета
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.1.2 Форма комплектации «UROGEN-Тест-5-MU» для проведения 96 реакций с мультиплексом MU (<i>Mycoplasma genitalium</i>, <i>Ureaplasma urealyticum</i>)	
ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость
Праймер-микс MU 2х	Прозрачная жидкость сиреневого цвета
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.1.3 Вариант исполнения «UROGEN-Тест-5-TN» для проведения 96 реакций с мультиплексом TN (<i>Trichomonas vaginalis</i>, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	
ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость
Праймер-микс TN 2х	Прозрачная жидкость сиреневого цвета

ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.1.4 Форма комплектации «UROGEN-Тест-5-Chl» для проведения 96 реакций с мультиплексом Chl (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	
ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость
Праймер-микс Chl 2х	Прозрачная жидкость сиреневого цвета
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	В соответствии с пунктом 1.4 ТУ 21.20.23-014-97638376-2019
1.3. Маркировка	В соответствии с пунктом 4 ТУ 21.20.23-014-97638376-2019
1.4. Упаковка	В соответствии с пунктом 5 ТУ 21.20.23-014-97638376-2019
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM/Green Ct≤35, ROX/Orange ≤35 и HEX/Yellow Ct≤35.
Отрицательный результат с ОКО	В пробирках с ОКО по каналам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange Ct не указан или >35.
Прохождение реакции в пробирках с КОЧ	В пробирках с КОЧ по каналам FAM, HEX и ROX Ct 28-35
Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналам FAM и ROX не указан, по каналу HEX Ct 25-30.

4.2 Характеристики аналитической эффективности

1. Форма комплектации «UROGEN-Тест-5-96» для проведения 96 реакций каждого мультиплекса (MU – <i>Mycoplasma genitalium</i>, <i>Ureaplasma urealyticum</i>; TN – <i>Trichomonas vaginalis</i>, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>; Chl – <i>Chlamydia trachomatis</i>)	
Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> и фрагменту ДНК гена <i>COMT</i> человека. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК <i>Gardnerella vaginalis</i> ; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Candida albicans</i> ; <i>Mycoplasma hominis</i> ; <i>Ureaplasma parvum</i> ; <i>Neisseria flava</i> ; <i>Neisseria</i>

	<i>subflava</i> ; <i>Neisseria sicca</i> ; <i>Neisseria mucosa</i> ; <i>Treponema pallidum</i> ; <i>Toxoplasma gondii</i> ; HSV 1 и 2 типа; CMV; HPV, а также ДНК человека в концентрации до 10 ⁸ копий/мл образца.
Аналитическая чувствительность	Не менее 500 копий на 1 мл ⁶ ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> .
2. Форма комплекта «UROGEN-Тест-5-MU» для проведения 96 реакций с мультиплексом MU (<i>Mycoplasma genitalium</i>, <i>Ureaplasma urealyticum</i>)	
Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> и фрагменту ДНК гена <i>COMT</i> человека. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> ; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Candida albicans</i> ; <i>Mycoplasma hominis</i> ; <i>Ureaplasma parvum</i> ; <i>Neisseria flava</i> ; <i>Neisseria subflava</i> ; <i>Neisseria sicca</i> ; <i>Neisseria mucosa</i> ; <i>Treponema pallidum</i> ; <i>Toxoplasma gondii</i> ; HSV 1 и 2 типа; CMV; HPV, а также ДНК человека в концентрации до 10 ⁸ копий/мл образца.
Аналитическая чувствительность	Не менее 500 копий на 1 мл ⁷ ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> .
3. Форма комплекта «UROGEN-Тест-5-TN» для проведения 96 реакций с мультиплексом TN (<i>Trichomonas vaginalis</i>, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	
Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> и фрагменту ДНК гена <i>COMT</i> человека. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> ; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Candida albicans</i> ; <i>Mycoplasma hominis</i> ; <i>Ureaplasma parvum</i> ; <i>Neisseria flava</i> ; <i>Neisseria subflava</i> ; <i>Neisseria sicca</i> ; <i>Neisseria mucosa</i> ; <i>Treponema pallidum</i> ; <i>Toxoplasma gondii</i> ; HSV 1 и 2 типа;

⁶ При использовании набора для выделения ДНК «НК-Экстра» производства ООО «ТестГен», объем образца 100 мкл, объем элюата – не более 50 мкл.

⁷ При использовании набора для выделения ДНК «НК-Экстра» производства ООО «ТестГен», объем образца 100 мкл, объем элюата – не более 50 мкл.

	CMV; HPV, а также ДНК человека в концентрации до 10 ⁸ копий/мл образца.
Аналитическая чувствительность	Не менее 500 копий на 1 мл ⁸ ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
4. Форма комплекта «UROGEN-Тест-5-Chl» для проведения 96 реакций с мультиплексом Chl (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	
Аналитическая специфичность	Специфичен по отношению к ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> и фрагменту ДНК гена <i>COMT</i> человека. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> ; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Candida albicans</i> ; <i>Mycoplasma hominis</i> ; <i>Ureaplasma parvum</i> ; <i>Neisseria flava</i> ; <i>Neisseria subflava</i> ; <i>Neisseria sicca</i> ; <i>Neisseria mucosa</i> ; <i>Treponema pallidum</i> ; <i>Toxoplasma gondii</i> ; HSV 1 и 2 типа; CMV; HPV, а также ДНК человека в концентрации до 10 ⁸ копий/мл образца.
Аналитическая чувствительность	Не менее 500 копий на 1 мл ⁹ ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> .

4.3 Характеристики клинической эффективности

Таблица 7 – Характеристики клинической эффективности

Вид исследуемого материала	Количество наблюдений	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Мазки со слизистой оболочки влагалища	26	90,9% (95% ДИ: 58,7%-99,8%)	100% (95% ДИ: 78,2%-100%)
Соскоб из цервикального канала	27	90% (95% ДИ: 55,5%-99,7%)	100% (95% ДИ: 80,5%-100%)
Соскоб из уретры	18	100% (95% ДИ: 63,1%-100%)	100% (95% ДИ: 69,2%-100%)
Клеточный осадок мочи	17	100%	100%

⁸ При использовании набора для выделения ДНК «НК-Экстра» производства ООО «ТестГен», объем образца 100 мкл, объем элюата – не более 50 мкл.

⁹ При использовании набора для выделения ДНК «НК-Экстра» производства ООО «ТестГен», объем образца 100 мкл, объем элюата – не более 50 мкл.

Вид исследуемого материала	Количество наблюдений	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
		(95% ДИ: 63,1%-100%)	(95% ДИ: 66,4%-100%)
Секрет предстательной железы	15	100% (95% ДИ: 59%-100%)	100% (95% ДИ: 63,1%-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов «UROGEN-Тест-5»

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами ПЦР;
3. проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);
4. невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;
5. использование непригодного для применения набора (использование по истечению срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия Набор реагентов для качественного выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «UROGEN-Тест-5» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 26 – в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских

изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «UROGEN-Тест-5», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «UROGEN-Тест-5», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «UROGEN-Тест-5», не токсичны, поскольку готовятся путём смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, заражённым или подозрительным на заражённость, проводят в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13), МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (МУ 1.3.2569-09).

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий". Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- удалять неиспользованные реактивы в соответствии с

СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий";

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

1. применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;
2. допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА III-IV групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также со средним специальным медицинским образованием);
3. не использовать набор по истечении срока годности;
4. избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть поражённое место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

Работа с набором реактивов для мультиплексной ПЦР «UROGEN-Тест-5» осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:

1. ПЦР-бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).
2. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или автоматических дозаторов переменного объема (например, «Eppendorf», Германия).
4. Холодильник от 2 °C до 8 °C с морозильной камерой не выше минус 16 °C.
5. Амплификатор¹⁰ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange, например, CFX96 (BioRad, США), «ДТпрайм» («ДНК-Технология», Россия), Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США).

Материалы и реактивы, не входящие в состав изделия:

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, «Axygen», США).
2. Одноразовые пробирки Эппендорф на 1,5 мл;
3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой для ПЦР:
 - пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл,
 - пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл в стрипах,

¹⁰ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики теста.

- планшеты для ПЦР с оптически прозрачной пленкой (например, «Ахуген», США).

4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька.

5. Ёмкость с дезинфицирующим раствором.

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Биологическим материалом для исследования являются:

- мазки со слизистой оболочки влагалища,
- соскоб из цервикального канала,
- соскоб из уретры,
- клеточный осадок первой порции свободно выпущенной мочи,
- секрет предстательной железы.

8.1 Процедура получения биологического материала

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012.

Забор биологического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами III группы патогенности.

Забор материала на исследование

Соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (цервикального канала, уретры, влагалища).

Забор материала осуществляют с помощью специальных стерильных одноразовых инструментов – урогенитальных зондов, цитощеток или тампонов, в зависимости от источника клинического материала. После взятия клинического материала погрузить рабочую часть зонда в пробирку объемом 1,5-2,0 мл, содержащую 300-500 мкл стерильного физиологического раствора, транспортную среду, предназначенную для транспортирования и хранения образцов

биоматериала для ПЦР-исследования. Если инструкция к набору реагентов предусматривает, оставить рабочую часть зонда в пробирке с транспортной средой, отломив её в области насечки. В случае отсутствия насечки или если оставление зонда не предусмотрено инструкцией, погрузить рабочую часть зонда в среду, и, прижав её к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5-10 сек., после чего зонд удалить, а пробирку плотно закрыть. Перед проведением процедуры экстракции нуклеиновых кислот осадить капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием (1 500 – 3 000 g), после чего аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе, избегая разбрызгивания и попадания материала на внутреннюю часть крышки.

Особенности взятия материала из уретры

Женщины накануне обследования не должны проводить туалет половых органов и спринцевание. Для получения объективного результата необходимо, чтобы исследуемый материал содержал возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи и примеси крови. Неправильное взятие биоматериала может привести к недостоверному результату и, вследствие этого, необходимости повторного взятия биоматериала.

Перед взятием биоматериала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5-2 ч. Непосредственно перед взятием биоматериала необходимо обработать наружное отверстие уретры тампоном, который можно смочить 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 биоматериала. В уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0-1,5 см, у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры.

Особенности взятия материала из влагалища

Материал должен быть взят до проведения мануального исследования. Зеркало перед манипуляцией можно смочить горячей водой, применение антисептиков для обработки зеркала противопоказано. Соскоб берут с заднебокового свода влагалища. У девочек взятие материала производят со слизистой оболочки

преддверия влагалища, а в отдельных случаях – из заднего свода влагалища через гименальные кольца.

Особенности взятия материала из цервикального канала.

Перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором. Зонд вводят в цервикальный канал на глубину 0,5-1,5 см. При извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание стенок влагалища

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

Моча

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20-30 мл в специальный сухой стерильный контейнер на 50 мл.

Предварительная обработка проб.

Взбалтывают контейнер с мочой. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные пробирки объемом 1,5 мл, центрифугируют 5 мин. при 10 000 g, при наличии большого количества солей ресуспендируют только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова концентрируют. Используя вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой, полностью удаляют супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавить транспортную среду до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Секрет предстательной железы

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

Условия транспортирования, хранения и утилизации исходного клинического материала:

- при +2 ... +8 °C – не более 24 ч.

- при -18 ... -22 °C – не более месяца.

ВНИМАНИЕ! Избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Учёт, хранение, передача и транспортирование биологического материала, подозрительного на наличие урогенитальных инфекций, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) (СП 1.3.3118-13) и действующими санитарными правилами о порядке учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.

Утилизация клинического материала (класс B), как чрезвычайно эпидемиологически опасных отходов, осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1 3684 21.

8.2 Выделение ДНК из биологического материала

Рекомендуется использование следующих комплектов для экстракции:

- Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот «РеалБест экстракция 100» производства АО Вектор-Бест, Россия (Регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1423 от 25.03.2017),

или аналогичных, предназначенных для выделения ДНК из клинического материала и обеспечивающих следующее качество выделенной ДНК:

- эффективность выделения ДНК – не менее 20%;

- отсутствие ингибирования ПЦР.

Во время процедуры выделения ДНК необходимо строго соблюдать протокол и требования инструкции применяемого набора реагентов.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК

- при +2 ... +8 °C – не более суток (24 ч),

- при -18 ... -22 °C – не более месяца,

- при минус 80 °C – длительно.

8.3 Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «UROGEN-Тест-5» было проверено в отношении

потенциально интерферирующих веществ, которые будут встречаться при процедуре забора биологического материала в следующих концентрациях:

Эндогенные интерферирующие вещества:

- 1) Гемоглобин - 100 мг/мл;
- 2) Гиалуроновая кислота - 50 мг/мл.

Экзогенные интерферирующие вещества:

- 3) Хлоргексидин – 0,05 г/мл;
- 4) Мирамистин (бензилдиметил[3 (миристоиламино) пропил]аммония хлорида моногидрат) – 0,1 мкг/мл;
- 5) Клотримазол – 200 мг/мл.

На основании результатов исследования потенциально интерферирующие вещества, встречающиеся при процедуре выделения ДНК из клинического материала, оцениваемые при концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «UROGEN-Тест-5», не оказывают влияние на результат анализа.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);

- не допускается использование образцов, загрязнённых посторонним биологическим материалом.

9. Проведение анализа

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать согласно таблице 5 непосредственно перед проведением анализа.

9.1. Подготовка компонентов набора для ПЦР

Перед приготовлением реакций необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нём, с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20-30 мин.

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ПЦР-буфером, Праймер-миксами, ОКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек., затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

2. Отобрать необходимое количество пробирок объёмом 0,1-0,2 мл для ПЦР из расчёта для каждого используемого мультиплекса: количество исследуемых образцов¹¹ + 1 ПКО + 1 ОКО.

В зависимости от необходимости выявления конкретных микроорганизмов и используемого варианта комплектации набора, каждый образец ставится с одним или несколькими мультиплексами (праймер-миксами). В таблице 8 приведена схема расположения ПЦР-пробирок при использовании трёх мультиплексов.

Таблица 8 – Схема расположения пробирок для ПЦР

Мультиплекс	Образец 1	Образец n	ПКО	ОКО
MU (<i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i>)	○	○	○	○
TN (<i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	○	○	○	○
Chl (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	○	○	○	○

Для приготовления каждой реакции необходимо:

1. ПЦР-буфер – 4 мкл,
2. Соответствующий праймер-микс (MU, TN или Chl) – 10 мкл,

¹¹ Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторях.

3. Образец (исследуемый образец ДНК⁹, ПКО, ОКО) – 6 мкл.

Общий объем реакции – 20 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции. При изменении объема чувствительность метода резко снижается!

9.2 Протокол проведения ПЦР

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 5 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,2 мл для ПЦР. Для каждого мультиплекса берётся необходимое количество пробирок для исследуемых образцов + 1 ПКО + 1 ОКО (таблица 9).

2. Внести в каждую пробирку по 4 мкл ПЦР-буфера¹².

3. Внести по 10 мкл Праймер-миксов (MU, TN, или ChI) в пробирки для соответствующих мультиплексов (таблица 9)⁸.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 6 мкл выделенной ДНК¹³. В пробирки для ПКО и ОКО ДНК не вносится.

6. Внести в соответствующие пробирки каждого используемого мультиплекса по 6 мкл ПКО.

7. Внести в соответствующие пробирки каждого используемого мультиплекса по 6 мкл ОКО.

8. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1-3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

9. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуются устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

10. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ПЦР указан в таблице 9.

¹² Рекомендуются сначала приготовить смесь праймер-микса и ПЦР-буфера для каждого мультиплекса в отдельной пробирке на 1,5-2,0 мл из расчёта: $(n+3) \times 4$ мкл ПЦР-буфера + $(n+3) \times 10$ мкл соответствующего праймер-микса, где n – количество образцов. Перемешать на вортексе, осадить капли коротким центрифугированием и внести по 14 мкл в ПЦР-пробирки для соответствующего мультиплекса согласно таблице 9.

¹³ Для предотвращения ингибирования ПЦР объём образца может быть снижен до 1-5 мкл, при этом объём реакции доводится до 20 мкл деионизированной водой из ОКО.

11. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

Таблица 9 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	95	00:15	-	5
	64	00:15		
3	95	00:05	FAM/Green, ROX/Orange, HEX/Yellow	40
	64	00:15		

12. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow и ROX/Orange.

13. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

14. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

10. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении ПЦР автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов FAM/Green, ROX/Orange и HEX/Yellow (табл. 10).

Сначала оценивают прохождение реакции и значения C_t в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

Таблица 10 – Интерпретация результатов по каналам FAM/Green, ROX/Orange и HEX/Yellow

Мультиплекс (праймер-микс)	Канал, соответствующий флуорофору		
	FAM/Green	ROX/Orange	HEX/Yellow
MU	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	KBM (ген <i>COMT</i> человека)
TN	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	KBM (ген <i>COMT</i> человека)
Chl	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	KBM (ген <i>COMT</i> человека)

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 11).

Таблица 11 – Результаты исследования для отрицательного и положительных контрольных образцов

Внесенный материал	Выбранный флуорофор		
	FAM/Green (<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i>)	HEX/ Yellow (KBM)	ROX/Orange (<i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>)
ОКО	Ct >35 или отсутствует	Ct >35 или отсутствует	Ct >35 или отсутствует
ПКО	Ct ≤35	Ct ≤35	Ct ≤35

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 12, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 11, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 11, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах
Принципы интерпретации результатов отражены в таблицах 12-14.

Таблица 12 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса MU (*Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*)

Значения Ct		Результат
Каналы спецификации (FAM/Green, ROX/Orange)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Ct FAM/Green ≤35	не учитывается	ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i> обнаружена
Ct FAM/Green отсутствует	Ct ≤35	ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i> не обнаружена
Ct FAM/Green >35	не учитывается	Результат на наличие ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i> сомнительный
Ct ROX/Orange ≤35	не учитывается	ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i> обнаружена
Ct ROX/Orange отсутствует	Ct ≤35	ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i> не обнаружена
Ct ROX/Orange >35	не учитывается	Результат на наличие ДНК <i>Ureaplasma urealyticum</i> сомнительный
Ct по обоим каналам спецификации >35 или отсутствует	Ct >35 или отсутствует	Результат невалидный

Таблица 13 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса TN (*Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*)

Значения Ct		Результат
Каналы спецификации (FAM/Green, ROX/Orange)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Ct FAM/Green ≤35	не учитывается	ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i> обнаружена
Ct FAM/Green отсутствует	Ct ≤35	ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i> не обнаружена
Ct FAM/Green >35	не учитывается	Результат на наличие ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i> сомнительный
Ct ROX/Orange ≤35	не учитывается	ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i> обнаружена
Ct ROX/Orange отсутствует	Ct ≤35	ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i> не обнаружена
Ct ROX/Orange >35	не учитывается	Результат на наличие ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i> сомнительный
Ct по обоим каналам спецификации >35 или отсутствует	Ct >35 или отсутствует	Результат невалидный

Таблица 14 – Принцип интерпретации результатов для мультиплекса Chl (*Chlamydia trachomatis*)

Значения Ct		Результат
Канал спецификации (FAM/Green)	Канал KBM (HEX/Yellow)	
Ct FAM/Green ≤35	не учитывается	ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> обнаружена
Ct FAM/Green отсутствует	Ct ≤35	ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> не обнаружена
Ct FAM/Green >35	не учитывается	Результат на наличие ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> сомнительный
Ct >35 или отсутствует	Ct >35 или отсутствует	Результат невалидный

Если для биологического образца регистрируется рост флуоресценции специфического продукта по каналам FAM/Green или ROX/Orange раньше 24 цикла (Ct < 24), то это говорит о высокой первоначальной концентрации ДНК соответствующего возбудителя. В данном случае возможно получение ложноотрицательного результата для возбудителя, ДНК которого присутствует в низкой концентрации, по второму каналу. Для исключения ложноотрицательных результатов рекомендуется повторно провести ПЦР выделенного препарата ДНК.

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация ДНК, присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ПЦР и др.

В случае невалидного и сомнительного результата заключение не выдаётся, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

При повторении сомнительного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

11. Информация о стабильности медицинского изделия

Срок годности набора. 12 месяцев.

Срок годности набора после вскрытия. 12 месяцев.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора

Хранение

Набор «UROGEN-Тест-5» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре +2 ... +8 °С до 90 суток.

Допускается заморозка/оттаивание набора «UROGEN-Тест-5» не более 10 раз.

После вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов «UROGEN-Тест-5» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Набор «UROGEN-Тест-5» транспортировать при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре +2 ...+8 °С до 30 суток, или при температуре окружающей среды, но не выше +30 °С не более 5 суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объём и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объём термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Срок годности

Срок годности набора реагентов «UROGEN-Тест-5» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при температуре минус 20 °С, соблюдении всех условий транспортирования и эксплуатации. Набор реагентов с истёкшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре минус 20 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твёрдым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «UROGEN-Тест-5» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «UROGEN-Тест-5» требованиям ТУ при соблюдении установленных требований к транспортированию, хранению и эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен»

(ООО «ТестГен»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13

Тел.: +7 (499) 705-03-75

www.testgen.ru

Служба технической поддержки:

Тел.: +7 927 981 58 81

E-mail: help@testgen.ru

Инструкция по применению соответствует требованиям Приказа Минздрава России от 09.01.2014 №2н, Приказа Минздрава России от 19.01.2017 № 11н, ГОСТ 51088-2013.

Приложение А

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro
ГОСТ 15150-69	Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для различных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения
ГОСТ 18321-73	Статистический контроль качества. Методы случайного отбора выборок штучной продукции
ГОСТ Р 50444-2020	Приборы, аппараты и оборудование медицинские. Общие технические условия
СанПиН 2.1.3684-21	Санитарно-эпидемиологические требования к

	содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий
ГОСТ 7625-86	Бумага этикеточная. Технические условия
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования
ГОСТ 15.309-98	Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
ГОСТ 12.1.005-88	Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
ГОСТ Р 8.657-2016	Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Фотометрия импульсная. Термины и определения
	Номенклатурная классификация медицинских изделий по видам, утвержденная приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н (в редакции приказа Минздрава России от 25.09.2014 № 557н «О внесении изменения в приложение № 1 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий»).
	Приказ Минздрава России от 09.01.2014 N 2н «Об утверждении Порядка проведения оценки

соответствия медицинских изделий в форме технических испытаний, токсикологических исследований, клинических испытаний в целях государственной регистрации медицинских изделий»

П р и м е ч а н и е – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

22 (двадцать два) листов

Должность: ген. директор

Тороповский А.Н.

