

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный технолог
Общества с ограниченной
ответственностью «НекстБио»



М.Ю. Сорокина
2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения ДНК
Mycoplasma hominis и *Gardnerella vaginalis* методом полимеразной
цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro

«АмплиПрайм[®] MH/GV»

АмплиПрайм[®]



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

<u>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</u>	55
<u>НАЗНАЧЕНИЕ</u>	55
<u>ПРИНЦИП МЕТОДА</u>	56
<u>ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ</u>	57
<u>АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ</u>	57
<u>ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ</u>	58
<u>МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ</u>	59
<u>ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ</u>	61
<u>ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА</u>	64
<u>ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК</u>	64
<u>ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ</u> <u>ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА</u>	64
<u>ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ</u>	65
<u>ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ</u>	65
<u>ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ 1 и 2 («ПЦР-комплект» вариант FER-100-0,2 или FER-100-0,5)</u>	66
<u>СОСТАВ</u>	66
<u>АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»</u>	66
<u>А. Подготовка пробирок для амплификации</u>	66
<u>Б. Проведение амплификации</u>	67
<u>В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»</u>	68
<u>Г. Интерпретация результатов</u>	69
<u>ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 3 (комплекты реагентов «АмплиПрайм[®] МАГНО-сорб-УРО» и</u> <u>«ПЦР-комплект» вариант FER-100-0,2)</u>	71
<u>СОСТАВ</u>	71
<u>АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»</u>	72
<u>А. Подготовка пробирок для амплификации</u>	72
<u>Б. Проведение амплификации</u>	73
<u>В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»</u>	73
<u>Г. Интерпретация результатов</u>	74
<u>СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ</u>	76
<u>ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ</u>	76
<u>СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ</u>	77
<u>ПРИЛОЖЕНИЕ 1</u>	78

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® *MH/GV*» предназначен для качественного определения ДНК *Mycoplasma hominis* и *Gardnerella vaginalis* в биологическом материале (отделяемое слизистой оболочки влагалища) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от пациенток с подозрением на наличие вульвовагинальной инфекции.

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

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL⁸) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов и ДНК ВКО-FL с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

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

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

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

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

⁸ ВКО-FL входит в состав комплекта реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из каждого исследуемого материала.

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
ДНК-мишень	ДНК <i>M. hominis</i>	ДНК <i>G. vaginalis</i>	ДНК ВКО-FL
Область амплификации	16S рРНК	16S рРНК	искусственно синтезированная последовательность

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

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

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

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

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

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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Микроорганизм	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл ⁹
отделяемое слизистой оболочки влагалища	«АмплиПрайм ТС» или «АмплиПрайм ТСМ» или «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ¹⁰	«АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ», «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО»	<i>M. hominis</i>	1x10 ³
			<i>G. vaginalis</i>	1x10 ³

⁹ Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ):

– в биологическом материале (отделяемое слизистой оболочки влагалища), помещенном в указанную транспортную среду, в пересчете на 1 мл.

¹⁰ Форма комплектации 3 или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ».

	«Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» ³	«АмплиПрайм ЭДЭМ»	<i>M. hominis</i>	1x10 ³
			<i>G. vaginalis</i>	1x10 ³

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

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

Аналитическая специфичность

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

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

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 3

Результаты тестирования набора реагентов «АмплиПрайм® МН/GV» в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиПрайм® МН/GV»		Результаты применения референтного метода ¹¹			
			<i>M. hominis</i>		<i>G. vaginalis</i>	
			положительных	отрицательных	положительных	отрицательных
отделяемое слизистой оболочки влагалища	Всего исследовано 526 образцов	положительных	101	2	270	1
		отрицательных	1	422	1	254

Были использованы образцы отделяемого слизистой оболочки влагалища полученных от 526 женщин репродуктивного возраста, обратившихся к акушеру-гинекологу с жалобами на дискомфорт и выделения из половых путей.

¹¹ В качестве референтного метода использовались наборы реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma hominis*-FL» (РУ № ФСР 2009/06559) и «АмплиСенс® *Gardnerella vaginalis*-FL» (РУ № ФСР 2010/07829).

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиПрайм® MH/GV»**

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ¹² (с доверительной вероятностью 95 %), не менее %		Диагностическая специфичность ¹³ , (с доверительной вероятностью 95 %), не менее %	
	<i>M. hominis</i>	<i>G. vaginalis</i>	<i>M. hominis</i>	<i>G. vaginalis</i>
отделяемое слизистой оболочки влагалища	97,5	97,7	98,3	98,2

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть односторонним. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

¹² Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

¹³ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹⁴. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – Safety data sheet) доступны по запросу.

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

¹⁴ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

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

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

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

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

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

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

3. Транспортная среда – «Транспортная среда с муколитиком «АмплиПрайм TCM» (РУ № ФСР 2012/14205), «Транспортная среда для мазков «АмплиПрайм ТС» (РУ № ФСР 2012/14203), «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» (форма комплектации 3 или 4 комплекта реагентов «АмплиПрайм ЭДЭМ») (РУ № ФСР 2012/14018) или другие рекомендованные Производителем.
4. Зонд гинекологический универсальный (например, ЗГУ «ЦМ», ООО «ЦЕНТРИМЕД», Россия или аналогичный).
5. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

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

При использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» совместно с

автоматическими станциями для экстракции НК:

8. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
9. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
10. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл или одноразовые 96-луночные планшеты (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные) – для элюции.
11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
14. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
15. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
16. Автоматические дозаторы переменного объема (например, «ООО Биохит», Россия, или аналогичные).
17. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neon 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) или аналогичная).
18. Комплект расходных материалов для автоматической станции для экстракции НК согласно инструкции Производителя.
19. Холодильник от 2 до 8 С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
20. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
21. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

При использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО» в случае ручной методики экстракции НК:

22. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
23. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
24. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).

25. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 26. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
 27. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.
 28. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 29. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
 30. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
 31. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия), или аналогичный).
 32. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 33. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 34. Отдельный халат, палочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 35. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
- Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации**
36. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США или аналогичные).
 37. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл или 0,2 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США или аналогичные).
 38. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
 39. Вортекс (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
 40. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
 41. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), MaxuGene Gradient (Axugen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США) и другие рекомендованные Производителем).
 42. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (АЛА-1/4) (SIA BioSan, Латвия), «Джин» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и другие рекомендованные Производителем).
 43. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

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

45. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит отделяемое слизистой оболочки влагалища (мазки, соскобы).

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

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

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Образцы мазков (соскобов) со слизистой оболочки влагалища не требуют предварительной подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

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

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

Объем ВКО-FL – 10 мкл в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

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

Объем элюции – 100 мкл.

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

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

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

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

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

СОСТАВ

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>M. hominis</i> / <i>G. vaginalis</i> распапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	110 пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-буфер-А-Фон ¹⁵	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	1 пробирка
K2 complex	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ^{16,17}	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

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

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью *M. hominis* / *G. vaginalis* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте б), а также двух образцов «Фон». Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.
2. Приготовить образцы «Фон». Для этого в две пробирки с ПЦР-смесью *M. hominis* / *G. vaginalis* на поверхность застывшего воска внести 20 мкл ПЦР-буфера-А-

¹⁵ Реагент используется при исследовании проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов для экстракции «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» и «АмплиПрайм® МАГНО-сорб-УРО».

¹⁶ Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология»).

¹⁷ Реагент входит только в состав «ПЦР-комплекта» вариант FER-100-0,5.

Фон. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.¹⁸

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

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

3. В пробирки для исследуемых и контрольных образцов на поверхность воска внести по 10 мкл **ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью *M. hominis* / *G. vaginalis***.
4. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.¹¹
5. Внести в подготовленные пробирки (кроме пробирок с образцами «Фон») по 10 мкл **проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

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

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К-). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл **К-**.

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 5).

¹⁸ Только при использовании «ПЦР-комплекта» вариант FEP-100-0,5.

2. Запустить выполнение программы амплификации. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), установить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.

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

Таблица 5

Программа амплификации

	Для амплификаторов группы 1 ¹⁹			Для амплификаторов группы 2 ²⁰			Для амплификаторов группы 3 ²¹		
Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
5	10	Хранение		10	Хранение		10	Хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»

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

Таблица 6

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

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

¹⁹ «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие рекомендованные Производителем.

²⁰ GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Group of The Applera Corporation) и другие рекомендованные Производителем.

²¹ MaxvGene Gradient (Axvgen Scientific Inc.) и другие рекомендованные Производителем.

Г. Интерпретация результатов

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

Таблица 7

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE	ROX	
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения	ДНК <i>M. hominis</i> и <i>G. vaginalis</i> НЕ обнаружена
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	Не учитывается	ДНК <i>M. hominis</i> обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения	Не учитывается	ДНК <i>G. vaginalis</i> обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	Невалидный*

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

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

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

Таблица 8

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция ДНК	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения
К–	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения
К+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения

Возможные ошибки

- Для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал флуоресценции по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE и/или ROX ниже порогового значения. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
- Для отрицательного контроля экстракции (ОК):

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

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

СОСТАВ

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор МАГНО-сорб	Прозрачная бесцветная жидкость ²²	50	1 флакон
Компонент А-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки
Раствор для отмывки 7	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Магнетизированная силика	Суспензия черного цвета	0,6	2 пробирки
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	13 пробирок
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

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

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

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

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

²² При хранении лизирующего раствора МАГНО-сорб при температуре ниже 20 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью *M. hominis* / *G. vaginalis* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте б), а также двух образцов «Фон». Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.
2. Приготовить образцы «Фон». Для этого в две пробирки с ПЦР-смесью *M. hominis* / *G. vaginalis* на поверхность застывшего воска внести 20 мкл ПЦР-буфера-А-Фон.

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

3. В пробирки для исследуемых и контрольных образцов на поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-буфера-К, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью *M. hominis* / *G. vaginalis*.
4. Внести в подготовленные пробирки (кроме пробирок с образцами «Фон») по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

5. Поставить контрольные реакции:

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

ВНИМАНИЕ! При подозрении на возможную контаминацию также необходима постановка отрицательного контроля ПЦР (К–). Для этого в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К–.

Б. Проведение амплификации

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

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

Таблица 9

Программа амплификации

	Для амплификаторов группы 1 ²³			Для амплификаторов группы 2 ²⁴			Для амплификаторов группы 3 ²⁵		
Цикл	Темпе- ратура, °С	Время	Кол-во циклов	Темпе- ратура, °С	Время	Кол-во циклов	Темпе- ратура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
5	10	Хранение		10	Хранение		10	Хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»

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

Таблица 10

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

²³ «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие рекомендованные Производителем.

²⁴ GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Group of The Applied Biosystems Corporation) и другие рекомендованные Производителем.

²⁵ MaxyGene Gradient (Axygen Scientific Inc.) и другие рекомендованные Производителем.

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

Г. Интерпретация результатов

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

Таблица 11

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора			Результат
FAM	JOE	ROX	
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения	ДНК <i>M. hominis</i> и <i>G. vaginalis</i> НЕ обнаружена
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	Не учитывается	ДНК <i>M. hominis</i> обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения	Не учитывается	ДНК <i>G. vaginalis</i> обнаружена
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	Невалидный*

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

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

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

Таблица 12

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
ОК	Экстракция ДНК	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения
К–	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения
К+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения

Возможные ошибки

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

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

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

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

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

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Максимальное число тестов



Код партии



Использовать до



Изделие для in vitro диагностики



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Дата изменения



Не допускать попадания солнечного света



Ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель



Беречь от влаги



Хрупкое. Осторожно



Верх

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

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

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

Порядок работы

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

1. Прогреть лизирующий раствор МАГНО-сорб при температуре 60°C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный и положительный контроли экстракции, если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования). Промаркировать.
3. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл ВКО-FL, компонент А-1 и магнетизированную силику из расчета на один образец: 10 мкл ВКО-FL, 10 мкл компонента А-1 и 10 мкл магнетизированной силики.²⁶ При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на один образец больше, например:

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

4. Внести в пробирки объемом 1,5 мл по 30 мкл подготовленной смеси ВКО-FL, компонента А-1 и магнетизированной силики.
5. Добавить в пробирки по 450 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб.
6. Внести в подготовленные пробирки по 100 мкл исследуемых образцов.
7. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести 100 мкл ОКО.
8. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 С на 10 мин.
9. Осадить капли на вортексе и перенести пробирки в магнитный штатив на 2 мин.

²⁶ Предварительное смешивание ВКО-FL, компонента А-1 и магнетизированной силики позволяет упростить процедуру экстракции. Возможно раздельное внесение этих реагентов.

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

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

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

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью
Всего 79 (символит девять) листов

Главный врач



С.А. Богдан

