



**ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ
ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК *Mycoplasma genitalium*
МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ**

«*Mycoplasma genitalium*-ПЛР»

НОМЕР ЗА КАТАЛОГОМ REF **K606G**



На 96 визначень



Для *in vitro* діагностики



ТОВ «ХЕМА» 03179 м.Київ, а/с 49
вул. Академіка Єфремова, 23
+38 (044) 422-62-16
clients@xema.com.ua
www.xema.in.ua



ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	2
3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СКЛАД	3
5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	4
6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	4
7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ	5
9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	6
10. КОНТРОЛЬ ПРОХОДЖЕННЯ РЕАКЦІЇ	7
11. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	7

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК *Mycoplasma genitalium* МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ «*Mycoplasma genitalium*-ПЛР»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «*Mycoplasma genitalium*-ПЛР» призначений для виявлення ДНК *Mycoplasma genitalium* методом ПЛР у реальному часі в препаратах нуклеїнових кислот (НК), виділених з клінічних зразків (зішкрібу з поверхні уретри, цервікального каналу, піхви тощо).

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Принцип дії набору реагентів «*Mycoplasma genitalium*-ПЛР» полягає в проведенні моноплексної ПЛР у реальному часі з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією. Метод полягає у багаторазовому подвоєнні специфічної ділянки ДНК за допомогою ДНК полімерази *in vitro*. У результаті утворюються копії ДНК, в кількості необхідній для достовірного визначення результату. У ході реакції копіюється тільки задана ділянка ДНК, яка задовольняє умови специфічності, що визначаються послідовністю праймерів і флуоресцентного зонда, і лише в тому випадку, якщо вона присутня у досліджуваному зразку.

Гібридизаційний зонд містить одночасно в своїй структурі флуорофор та гасник флуоресценції. У разі позитивної реакції гібридизаційний зонд відпалюється на копіях заданої ділянки ДНК і руйнується полімеразою, що супроводжується відділенням флуорофору від гасника, при цьому флуоресценція суміші зростає. Дана флуоресценція вимірюється ампліфікатором у режимі реального часу. До складу ДНК-зонда, що використовується для детекції продуктів ампліфікації фрагмента генома *Mycoplasma genitalium*, включена флуоресцентна мітка FAM/Green.

Необхідною умовою якісного аналізу наявності цільових організмів в клінічних зразках є правильна техніка відбору зразка, вибір правильних транспортних пробірок, коректний режим транспортування, зберігання і т.д.

Показником правильного відбору біоматеріалу є достатня кількість геномної ДНК людини в пробі, яка контролюється показником КБ (контроль біоматеріалу). Джерелом цієї ДНК є епітеліальні клітини, що потрапляють у пробу при правильній техніці відбору біоматеріалу. До складу ДНК-зонда, що використовується для детекції продукту ампліфікації КБ, входить флуоресцентна мітка HEX/Yellow.

Виявлення ДНК *Mycoplasma genitalium* в досліджуваних зразках складається з двох етапів:

- 1) екстракція ДНК;
 - 2) ампліфікація специфічних ділянок ДНК методом ПЛР у реальному часі.
- Інтерпретація результату проходить у два етапи:
- 1) оцінка біоматеріалу (КБ) - достовірно/недостовірно;
 - 2) оцінка специфіки - знайдено/не знайдено.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналітична чутливість.

Аналітична чутливість набору складає 1×10^3 *копій/мл (копій специфічної ДНК мішені на 1мл біологічного зразка) для наступних видів клінічного матеріалу: зішкроби з поверхні уретри, цервікального каналу, піхви.

Діагностична чутливість набору складає не менше 98%.

3.2 Специфічність.

Були відсутні неспецифічні реакції при тестуванні зразків ДНК людини і панелі зразків ДНК наступних мікроорганізмів: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, HSV 1 і 2 типу, CMV, HPV (типи 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59).

Діагностична специфічність набору складає не менше 98%.

*3 наборами для виділення від інших виробників чутливість може відрізнятися.

4. СКЛАД

Форма випуску 1 розрахована на проведення 96 тестів. Набір може бути використаний для ручної та автоматичної методики постановки реакцій ПЛР.

	Компонент	Опис	Об'єм, мл	К-ть
1	Буфер <i>M. genitalium</i>	прозора рідина від безбарвного до рожевого кольору	1.5	1 шт
2	Полімераза	прозора безбарвна рідина	0.1	1 шт
3	ПКЗ <i>M. genitalium</i> *	прозора безбарвна рідина	0.3	1 шт
4	НКЗ**	прозора безбарвна рідина	0.5	1 шт
5	Інструкція з використання набору реагентів « <i>Mycoplasma genitalium</i> -ПЛР».		-	1 шт
6	Паспорт контролю якості набору реагентів « <i>Mycoplasma genitalium</i> -ПЛР».		-	1 шт

*ПКЗ *M. genitalium* – позитивний контрольний зразок набору «*Mycoplasma genitalium*-ПЛР».

**НКЗ - негативний контрольний зразок.

УВАГА! Комплект реагентів для виділення ДНК з біологічного матеріалу не входить до складу набору «*Mycoplasma genitalium*-ПЛР».

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

Роботу слід проводити в лабораторії, що виконує молекулярно-біологічні дослідження клінічного матеріалу методом ПЛР на присутність інфекційних захворювань, із дотриманням ДСанПіН 9.9.5-153-2008. Державні санітарні норми і правила «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» та «Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами» Наказ МОЗ України 08.06.2015 № 325.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- тонкостінні пробірки для ПЛР у реальному часі об'ємом 0.2 мл з опуклою або плоскою оптично-прозорою безбарвною кришкою, або пробірки об'ємом 0.2 мл в стріпах з прозорими кришками - при використанні приладу планшетного типу;
- тонкостінні пробірки для ПЛР об'ємом 0.2 мл з плоскою кришкою або пробірки для ПЛР до Rotor-Gene об'ємом 0.1 мл в стріпах по 4 шт. з кришками - при використанні приладу роторного типу;
- штативи для пробірок об'ємом 0.2 мл або 0.1 мл;
- пробірки, які щільно закриваються, об'ємом 1.5 мл для приготування реакційної суміші;
- штативи для пробірок об'ємом 1.5 мл;
- одноканальні дозатори змінного об'єму 1-20 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразові наконечники з фільтром для для дозаторів змінного об'єму, з маркуванням «RNAase-free, DNAase-free» об'ємом 1-20 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000мкл;
- ампліфікатор для проведення полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ДНК-Технологія), CFX- 96 (Bio-Rad, США); RotorGene 3000, 6000 (CorbettResearch, Австралія) і Rotor-GeneQ (QIAGEN, Німеччина) або інші ампліфікатори з аналогічними технічними характеристиками);
- ламінарний бокс, клас біологічної безпеки II, тип A;
- центрифуга-вортекс;
- холодильник побутовий від 2 до 8 °С з морозильною камерою не вище мінус 16 °С;
- засоби індивідуального захисту (одноразовий халат, шапочка, маска, взуття та рукавички);
- ємність з кришкою для утилізації відходів.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Буфер *M. genitalium* перед проведенням дослідження необхідно довести до кімнатної температури (+18...+25 °C), ретельно перемішати і осадити краплі за допомогою центрифуги.

7.2. Полімераза необхідно дістати із морозильної камери безпосередньо перед використанням, ретельно перемішати і осадити краплі за допомогою центрифуги.

7.3. Приготувати реакційну суміш. Провести активацію необхідної кількості буферу *M. genitalium* шляхом додавання полімерази. Суміш готувати з розрахунку $n + 3$, де n - кількість зразків для аналізу, 3 - число додаткових пробірок. Додаткові пробірки необхідні для позитивного (ПКЗ *M. genitalium*), негативного контрольного зразка (НКЗ) і мінімального запасу на похибку піпетування (1 зразок). Приклад розрахунку необхідної кількості реагентів наведено в таблиці нижче. Після приготування реакційної суміші необхідно ретельно перемішати її за допомогою вортекса і осадити краплі з кришки пробірки.

Максимальна кількість пробірок	50	40	30	20	10
Буфер <i>M. genitalium</i> , мкл	750	600	450	300	150
Полімераза, мкл	50	40	30	20	10

Готову суміш зберігати при температурі +2...+8 °C не довше 8 годин.

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ

8.1. Набір реагентів «*Mycoplasma genitalium*-ПЛР» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі -16...-20 °C.

8.2. Готову суміш буфера та полімерази можна зберігати при температурі +2...+8 °C не довше восьми годин.

8.3. Якщо негайна постановка ампліфікації неможлива, допускається зберігання сумішей зразків ДНК з активованим буфером при температурі +2...+8 °C не довше двох годин.

8.4. Набори, що зберігалися з порушенням регламентованого режиму, застосуванню не підлягають.

8.5. Набір реагентів транспортувати критим транспортом (автомобільним, залізничним або повітряним) в термоконтейнерах, що містять холодоелементи при температурі +2...+25 °C не довше 5 діб.

8.6. Набори, транспортовані з порушенням температурного режиму, застосуванню не підлягають.

8.7. Для отримання надійних результатів необхідно суворе дотримання інструкції з використання набору.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

9.1. Поставити в штатив необхідну кількість пробірок або стрипів для ампліфікації ДНК досліджуваних і контрольних проб.

9.2. Внести 15 мкл активованого буфера в кожен пробірку.

9.3. У підготовлені пробірки з активованим буфером додати по 10 мкл ДНК-проб, що досліджуються, і негативний контрольний зразок (НКЗ), закрити всі кришки за винятком пробірки для ПКЗ *M. genitalium*.

9.4. Додати у відповідну пробірку 10 мкл ПКЗ *M. genitalium*, закрити кришку.

9.5. Встановити усі пробірки (стрипи) в блок ампліфікатора.

9.6. Запрограмувати ампліфікатор, відповідно до інструкції виробника приладу, і запустити відповідну програму ампліфікації (див. таблиці нижче).

Програма ампліфікації для приладів планшетного типу (ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ДНК-Технологія), CFX-96 (Bio-Rad))

№ блоку	Температура, °C	хв	сек	Кількість циклів	Детекція	Тип блоку
1	95	15	00	1		цикл
2	94	0	30	5		цикл
	64	0	17		v	
3	94	0	10	40		цикл
	64	0	17		v	
4	30	-	-	зберігання		зберігання

Програма ампліфікації для приладів роторного типу (Rotor Gene 3000, 6000 (Corbett Research) та Rotor-Gene Q (QIAGEN))

№ блоку	Температура, °C	хв	сек	Кількість циклів	Детекція	Тип блоку
1	95	15	00			Hold/ Утримування температури
2	94	0	20	5		Cycling/ Циклювання
	62	0	25		v	
3	94	0	10	40		Cycling 2/ Циклювання 2
	62	0	25		v	

9.7. Після закінчення виконання програми приступити до аналізу та інтерпретації результатів.

10. КОНТРОЛЬ ПРОХОДЖЕННЯ РЕАКЦІЇ

10.1. У паспорті, що входить до кожної серії набору «*Mycoplasma genitalium*-ПЛР», вказані граничні значення порогового (індикаторного) циклу для позитивного контрольного зразка (ПКЗ *M. genitalium*) та контролю біоматеріалу (КБ) по відповідному каналу флуоресценції.

10.2. Для кожної постановочної серії робиться висновок про достовірність результатів тесту на підставі порівняння отриманих показників ПКЗ *M. genitalium* із паспортними.

10.3. При отриманні значень порогового циклу, що перевищують гранично допустимі для ПКЗ *M. genitalium*, результати всієї постановочної серії вважаються недостовірними. Всі зразки повинні бути досліджені повторно, починаючи з етапу ампліфікації.

10.4. При отриманні значень порогового циклу нижче гранично допустимого для НКЗ, результати всієї постановочної серії вважаються недостовірними. Необхідне проведення дослідження повторно, починаючи з етапу екстракції ДНК.

Канал	НКЗ	ПКЗ	НКЗ	ПКЗ
FAM <i>M.genitalium</i>	>39 циклу	Відповідає паспортному значенню	<39 циклу	Не відповідає паспортному значенню
HEX Контроль біоматеріалу	>39 циклу	Відповідає паспортному значенню	<39 циклу	Не відповідає паспортному значенню
	Достовірно	Достовірно	Недостовірно. Провести аналіз повторно починаючи з етапу виділення ДНК	Недостовірно. Провести аналіз повторно починаючи з етапу ампліфікації

11. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

11.1. Для інтерпретації результатів необхідно проаналізувати отримані дані – криві накопичення флуоресцентного сигналу по двом каналам:

- продукт ампліфікації ДНК *Mycoplasma genitalium* - по каналу **FAM/Green**;
- продукт ампліфікації ДНК **КБ** – по каналу **HEX/Yellow**.

11.2. Результати інтерпретуються в наступному порядку:

11.2.1. Аналіз результатів ампліфікації ДНК КБ для відповідного біоматеріалу по каналу **HEX/Yellow**:

- Якщо в таблиці результатів по каналу **HEX/Yellow** визначено значення порогового циклу **Ct**, що не перевищує 33 цикли (конкретне значення для кожної серії слід уточнювати в паспорті), то результат вважається достовірним, і можна переходити до наступного етапу аналізу результатів.

- Якщо для даної проби значення **Ct** не визначене (відсутнє) або перевищує значення порогового циклу **Ct** КБ по каналу HEX/Yellow (див. таблицю нижче і паспорт на серію набору), то результат вважається недостовірним. У цьому випадку необхідно провести повторне ПЛР-дослідження відповідного зразка.

Якщо недостовірний результат відтворюється, то отримані дані по каналу FAM/Green не враховуються, рекомендується призначити повторний забір біоматеріалу.

11.2.2. Аналіз результатів фрагментів ДНК *M. genitalium* по каналу FAM/Green:

- ДНК *M. genitalium* **виявлена**, якщо для даної проби в таблиці результатів по каналу FAM/Green визначено значення, і воно не перевищує значення порогового циклу *Ct*. Характерне значення порогового *Ct* для каналів FAM - 39. (Конкретне значення для кожної серії слід перевіряти в паспорті).
- ДНК *M. genitalium* **не виявлена**, якщо для даної проби значення *Ct* по каналу FAM/Green не визначене (відсутнє) або перевищує значення порогового циклу *Ct* по FAM/Green.

Канал	Зразок	Зразок	Зразок
FAM <i>M. genitalium</i>	>39 циклу	<39 циклу	>39 циклу
HEX Контроль біоматеріалу	<33 циклу	<33 циклу	>33 циклу
	Достовірно. ДНК <i>M. genitalium</i> не виявлена	Достовірно. ДНК <i>M. genitalium</i> виявлена	Недостовірно. Провести аналіз повторно починаючи з етапу відбору зразка

Символ	Значення символу
	Виробник
	Номер за каталогом
	Номер партії
	Використати до
	Обмеження температури
	Тільки для ін вітро діагностики
	Увага!
	Інструкція з використання

Номер гарячої лінії технічної підтримки Клієнтів:

0-800-50-29-62

Усі дзвінки за номером гарячої лінії безкоштовні з будь-якого мобільного або стаціонарного телефону на всій території України.

ТОВ «Хема», 03179, м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23

{ +38 (044) 422-62-16

📞 +38 (050) 422-62-16

✉ e-mail: clients@xema.com.ua

📍 XEMA Kiev

