



Набор реагентов для выявления ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*
методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® Микоплазма»

АмплиПрайм® Микоплазма

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

REF V2169-1Z  96

Только для ветеринарных и других
немедицинских целей



ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	4
2.1. Состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	5
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	5
4. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	6
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	6
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	8
6.1. Взятие исследуемого материала	8
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала.....	8
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	9
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	9
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	10
7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала	10
7.2. Подготовка материала к исследованию.....	12
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	13
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала.....	13
8.2. Подготовка реагентов для амплификации.....	13
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	14
8.4. Анализ и обработка результатов	15
8.5. Интерпретация результатов	15
8.6. Возможные ошибки	16
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	17
9.1. Аналитическая чувствительность	17
9.2. Аналитическая специфичность.....	17
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	18
10.1.Срок годности	18
10.2.Транспортирование.....	18
10.3.Хранение	18
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	18
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	19

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	внутренний контрольный образец
ГОСТ	государственный стандарт
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаз	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
МУ	методические указания
НК	нуклеиновые кислоты
ОК	отрицательный контроль экстракции
ОКО	отрицательный контрольный образец
К-	отрицательный контроль ПЦР
ПК	положительный контроль
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РФ	Российская Федерация
СанПиН	санитарные правила и нормы
УДГ	урацил-ДНК-гликозилаза
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Микоплазма».

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® Микоплазма», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® Микоплазма» предназначен для выявления ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* в биологическом материале от животных (цельная кровь, мазки со слизистых оболочек верхних дыхательных путей, урогенитального тракта, эякулят, тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы, трахея, воздухоносные мешки)), а также из чистых или смешанных культур микроорганизмов, полученных в результате культивирования вышеупомянутых образцов, методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Набор выпускается в единой форме. Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно.

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации ДНК методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь Микоплазма	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,60	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Микоплазма	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контроль ПЦР. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов	–	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде по адресу: nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Паспорт качества на набор	в электронном виде по адресу: nextbio.ru	-
Вкладыш к набору для автоматической обработки результатов	в бумажном виде	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования состоит из нескольких этапов. На первом этапе осуществляется экстракция ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В). На втором этапе проводится одновременная амплификация ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* и ДНК внутреннего контрольного образца ВКО В (искусственно синтезированная последовательность), при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы.

Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды 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 с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

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

На этапе ПЦР одновременно в одной пробирке проходит амплификация ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* и ДНК внутреннего контрольного образца ВКО В. Результаты амплификации регистрируются по 2-м различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие НК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	R6G ¹	Cy5
ДНК-мишень	ДНК микроорганизмов рода <i>Mycoplasma</i>	ВКО В
Область амплификации	16S рПНК	Искусственно синтезированная последовательность

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с ISO 13485-сертифицированной Системой Менеджмента Качества компании ООО «НекстБио», каждая серия набора реагентов «АмплиПрайм® Микоплазма» проверяется на соответствие заранее определенным требованиям для обеспечения постоянного качества продукции.

¹ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow.

4. ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

- 4.1. Набор применяется только для ветеринарных и других немедицинских целей.
- 4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов материалов может привести к получению недостоверных результатов.
- 4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).
- 4.4. С помощью набора «АмплиПрайм® Микоплазма» возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом экстракции – «ВКО В», входящим в состав набора для проведения экстракции НК. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.
- 4.5. Применение набора возможно только персоналом, обученным правилам работы в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования.
- 4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- 5.1. Работа должна проводиться в лабораториях, выполняющих молекулярно-биологические исследования. ПЦР-исследования должны проводиться с соблюдением требований 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» и правил «Правила проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (основные положения)» (утверждены приказом руководителя Департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ 27.01.1997).
- 5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:
- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.
 - Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
 - Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.
 - Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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 фильтром.

- Посуда (ступки и пестики) и металлические инструменты (скальпели, ножницы, пинцеты и т.п.), использованные для предподготовки проб, выдерживаются в растворе дезинфицирующего средства (например, 0,2 % раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты) в течение одного часа, моются водопроводной водой с поверхностно-активными моющими средствами и после отмывания в проточной и деионизованной воде высушиваются в сухожаровом шкафу в течение 4 часов при температуре 180 °С.

- 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 при проведении ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав и комплектность»).

- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.

- 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.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место водой и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- канцерогенный эффект отсутствует;

- мутагенное действие отсутствует;

- репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50 - 60 мл, стерильный.

6.1.2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл и 2,0 мл.

6.1.3. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала, содержащая консервант или стерильный физиологический раствор.

6.1.4. Ножницы, скальпели, пинцеты.

6.1.5. Пакеты с застежкой Zip-lock.

6.1.6. Вакуумные пробирки для забора крови с антикоагулянтом (ЭДТА, цитратом натрия).

6.1.7. Двухсторонние иглы для забора крови в вакуумные пробирки.

6.1.8. Стерильная посуда.

6.1.9. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.1.10. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.1.11. Шпатель одноразовый для взятия биологического материала.

6.1.12. Бактериологическая петля.

6.1.13. Зонд для взятия биологического материала со слизистых оболочек.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.2.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2,0 мл.

6.2.2. Одноразовые полипропиленовые пробирки типа «Falcon» объемом 5, 15 или 50 мл.

6.2.3. Стерильные фарфоровые ступки и песты или автоматический гомогенизатор.

6.2.4. Вортекс.

6.2.5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 – 2,0 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.6. Центрифуга для полипропиленовых пробирок типа «Falcon» с ускорением не менее 2 000 g.

6.2.7. Ножницы, скальпели, пинцеты, лопатка.

6.2.8. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала, содержащая консервант или стерильный физиологический раствор.

6.2.9. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 10 до 1000 мкл.

6.2.10. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.2.11. Стеклоанная или полипропиленовая воронка.

6.2.12. Аналитические или прецизионные весы.

6.2.13. Фосфатно-солевой буфер или стерильный физиологический раствор.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК/РНК «МагноПрайм® ВЕТ» («Формат 96») производства ООО «НекстБио», Россия, или «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ» производства ООО «НекстБио», Россия, или любой другой набор, соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять НК из биологического материала от животных (цельная кровь, мазки со слизистых оболочек верхних дыхательных путей, урогенитального тракта, эякулят, тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы, трахея, воздухоносные мешки)), а также из чистых или смешанных культур микроорганизмов, полученных в результате культивирования вышеупомянутых образцов, для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- состав набора включает реагент ОКО (отрицательный контрольный образец) и ВКО В (внутренний контрольный образец);
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 50 мкл.

ВНИМАНИЕ! При использовании наборов для экстракции ДНК других производителей, необходимо дополнительно приобрести набор реагентов «МагноПрайм® ВЕТ» формы выпуска «Формат Контроли». Реагент ВКО В следует добавлять во все исследуемые образцы, а также в отрицательный контрольный образец (ОКО).

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз/РНКаз, следующих видов:

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора планшетного типа;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании амплификатора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз/РНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции - в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

6.4.8. Программируемый амплификатор роторного или планшетного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», соответствующий следующим требованиям:

- наличие двух и более независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров R6G и Cy5 с характеристиками, указанными в таблице 4:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
R6G	515	532	545	580
Cy5	620	640	660	690

- для приборов планшетного типа верхняя граница температурного диапазона не менее 99 °С;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,5$ °С;
- скорость нагрева не менее 1,5 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

6.4.9. Холодильник, поддерживающий температурный режим от 2 °С до 8 °С.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит:

- образцы цельной крови;
- мазки со слизистых оболочек верхних дыхательных путей, урогенитального тракта;
- эякулят;
- тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы, трахея, воздухоносные мешки);
- чистые или смешанные культуры микроорганизмов, полученные в результате культивирования вышеупомянутых образцов.

7.1. Взятие и транспортировка исследуемого материала

7.1.1. Взятие венозной крови проводится после длительного голодания (не менее 6 часов) в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитрата натрия).

Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Допускается хранение образцов цельной крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 °С до 25 °С – в течение 6 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 2 суток.

ВНИМАНИЕ! Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

7.1.2. Мазки со слизистых оболочек верхних дыхательных путей получают с помощью стерильных зондов с ватными тампонами. После отбора материала рабочую часть зонда с ватным тампоном помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл стерильного физиологического раствора. Конец зонда отламывают для того, чтобы крышка пробирки плотно закрылась. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается хранение образцов мазков до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °C – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °C – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °C – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.1.3. Мазки со слизистой оболочки урогенитального тракта берут из заднебокового свода влагалища с помощью стерильного одноразового зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой. Необходимо максимально полно собрать отделяемое. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается хранение образцов мазков до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °C – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °C – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °C – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

7.1.4. Эякулят отбирают в объеме 1,5 – 2,0 мл в пластиковые контейнеры для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50 - 60 мл.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 до 25 °C – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °C – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °C – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °C – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

7.1.5. Тканевой (аутопсийный) материал (паренхиматозные органы, трахея, воздухоносные мешки) отбирают в стерильные пластиковые контейнеры.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 20 °С до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

7.1.6. Чистые или смешанные культуры микроорганизмов, полученные в результате культивирования вышеупомянутых образцов, отбирают с помощью стерильной бактериологической петли в пробирку с транспортной средой, стерильным физиологическим раствором или стерильной дистиллированной водой объемом 500 мкл, перемешивают.

Образцы исследуемого материала хранят при следующих условиях:

- при температуре от 20 °С до 25 °С – в течение 24 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 7 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 12 месяцев;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.2. Подготовка материала к исследованию

7.2.1. Цельную кровь, мазки со слизистых оболочек верхних дыхательных путей, урогенитального тракта, чистые и смешанные колонии исследуют без предварительной пробоподготовки.

7.2.2. Эякулят непосредственно перед выделением нуклеиновых кислот, используя наконечник с фильтром, переносят 50 мкл в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл и добавляют 150 мкл транспортной среды, тщательно перемешивают пробу на вортексе.

7.2.3. Тканевой (аутопсийный) материал гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматического гомогенизатора, затем готовят 10 % суспензию, используя стерильный физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 400 g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость используют для экстракции НК.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата лаборатории²:

- температура окружающего воздуха от 20 °С до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! Рекомендуем для выделения НК из эякулята не использовать наборы на основе преципитации.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца (ОКО)³ в одном повторе. При проведении экстракции ДНК, во все пробы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО В).

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем исследуемого образца⁴ – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента **ВКО В** - **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольным образцами;
- объем реагента **ОКО** - **100 мкл** в пробирку для **ОКО**;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **50 мкл** (при использовании набора для экстракции НК «АмплиПрайм® РИБО-преп ВЕТ») или **100 мкл** (при использовании набора «МагноПрайм® ВЕТ» или **50 – 100 мкл** (при использовании другого набора для экстракции согласно инструкции к нему).

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси Микоплазма** и **Буфера В**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь Микоплазма	10,0*(N+1)	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли.
Буфер В	5,0*(N+1)	

² Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

³ Входит в состав набора, рекомендованного Производителем для проведения экстракции нуклеиновых кислот.

⁴ Для некоторых видов образцов требуется предварительная подготовка согласно разделу «Исследуемый материал».

8.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Микоплазма** и **Буфером В** на вортексе, осадить капли кратким центрифугированием.

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь на вортексе и осадить капли кратким центрифугированием.

8.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученных на этапе экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

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

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции.

8.3.2. Внести контрольные образцы:

а) положительный контроль ПЦР (ПК) – в одну пробирку для образца **ПК** внести **10 мкл ПКО Микоплазма**.

б) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в одну пробирку для образца **ОК** внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из **ОКО**.

в) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл** реагента **К-**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения «Единой» программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	R6G, Cy5	

Примечание: с использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание: необходимо перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и обработка результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИЛС», Россия), выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору;

– в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению, инструкции по применению набора и краткому руководству, прилагаемому к набору.

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по 2-м каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	R6G	Cy5
Продукт амплификации	ДНК микроорганизмов рода <i>Mycoplasma</i>	ВКО В

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

– вручную в соответствии с таблицей 9. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице;

– в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИЛС», Россия), выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Критерии валидности результатов, полученных для контролей, и алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов, используемые в программном обеспечении, представлены в таблицах 8 и 9 соответственно, и в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Значение порогового цикла (Ct) для амплификаторов роторного / планшетного типов по каналу для флуорофора	
	R6G	Cy5
ПКО Микоплазма (положительный контроль)	Определено значение Ct не выше граничного ⁵	Отсутствует
ОК (отрицательный контроль экстракции)	Отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результаты (значение порогового цикла (Ct) для приборов роторного / планшетного типов)	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено не выше граничного ⁵ .	ДНК микроорганизмов рода <i>Mycoplasma</i> не обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G определено. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено или отсутствует.	ДНК микроорганизмов рода <i>Mycoplasma</i> обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G отсутствует, при этом значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 определено выше граничного или отсутствует.	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров R6G и / или Cy5 определены значения пороговых циклов (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов на этапе ПЦР. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа ПЦР.

8.6.3. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию/ПЦР и детекцию для этого образца.

⁵ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве, прилагаемом к набору.

8.6.4. Для исследуемого образца отсутствует значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров R6G и Cy5, что свидетельствует о некачественном проведении экстракции нуклеиновых кислот или наличии ингибиторов. Требуется повторно провести исследование данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор, предварительную подготовку и исследование образца.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность набора «АмплиПрайм® Микоплазма» составляет $1,0 \times 10^3$ копий/мл для ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* (см. таблицу 10). Значение характеристики, указанной в таблице 10, достигается при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 10

Аналитическая чувствительность набора

НК-мишень	Аналитическая чувствительность, копий/мл
ДНК микроорганизмов рода <i>Mycoplasma</i>	$1,0 \times 10^3$

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты геномной ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием НК микроорганизмов (см. таблицу 11). НК микроорганизмов в концентрации не менее $1,0 \times 10^6$ копий/мл, вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемую с помощью набора геномную ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*.

Таблица 11

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Brucella ovis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Brucella melitensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Brucella suis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Influenza A virus</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-

При тестировании образцов НК вышеперечисленных микроорганизмов с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с холодоэлементами или в авторефрижераторах.

Допускается транспортирование не более 3 суток при температуре от 8 до 25 °С.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси Микоплазма и Буфера В, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® Микоплазма» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: nextbio.ru.

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Каталожный номер



Изготовитель



Номер серии



Дата изготовления



Не допускать попадания
солнечного света



Срок годности



Число исследования



Температурный
диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению