

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

26.08.2022

А.В. Ходяков

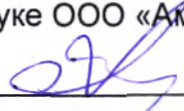


НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК *Mycoplasma genitalium* МЕТОДОМ ПЦР С
ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»
(AMPLITECH MG)

Инструкция по применению версии 26.08.22

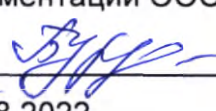
Лист утверждения

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

 А.С. Коновалов

26.08.2022

Руководитель отдела разработки
документации ООО «Амплитек»

 Д.А. Бурдачёва

26.08.2022

Amplitech MG

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech MG)

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

IVD

REF

P010-0

 96

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ	4
1.1 Область применения	4
2 СОСТАВ.....	4
3 ПРИНЦИП МЕТОДА	5
3.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК U.....	5
4 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	5
5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
6 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	7
7 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	9
7.1 Экстракция ДНК.....	9
7.2 Подготовка к проведению ПЦР	9
7.3 Проведение ПЦР и детекции.....	10
8 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	10
9 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ	12
10 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	12
10.1 Контроли, используемые в процессе исследования	12
10.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации.....	13
10.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований.....	13
11 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	13
11.1 Предел обнаружения.....	13
11.2 Диапазон измерения и предел измерения.....	13
11.3 Аналитическая специфичность.....	13
11.4 Прецизионность измерения	15
11.5 Правильность измерения	15
11.6 Диагностические характеристики	15
11.7 Корреляция.....	15
12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	16
12.1 Срок годности.....	16
12.2 Хранение	16
12.3 Транспортирование	16
12.4 Эксплуатация	16
13 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ	16
14 БИБЛИОГРАФИЯ.....	17
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	17
16 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	18
17 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА.....	18
18 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	18

ВВЕДЕНИЕ

1. Настоящая инструкция по применению версии 26.08.22 распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech MG)» по ТУ 21.20.23-016-19926214-2022 (далее – набор).

Краткое наименование набора: Amplitech MG.

Набор следует применять в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Для удобства работы в лаборатории допускается использовать действующую версию краткого руководства по применению набора.

2. Микроорганизм *Mycoplasma genitalium* является возбудителем инфекционно-воспалительных заболеваний уrogenитального тракта. Для данного микроорганизма отсутствуют специфические клинические признаки, на основании которых можно установить этиологию заболевания. ПЦР в реальном времени обладает высокой чувствительностью, специфичностью и объективностью полученных результатов [1]. Набор реагентов «Amplitech MG» позволяет выявлять и количественно измерять ДНК *Mycoplasma genitalium*.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* в биологическом материале человека методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы ДНК, экстрагированной из следующих видов биологического материала:

- мазки со слизистой оболочки влагалища;
- соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, уретры;
- секрет предстательной железы, моча (осадок первой порции утренней мочи).

1.1 Область применения

Набор предназначен для применения в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекций, передаваемых половым путём. Отрицательные результаты исследования с помощью набора не исключают возможность инфицирования *M. genitalium* и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациента. Отрицательные результаты исследования должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Набор может применяться в клиничко-диагностических лабораториях.

2 СОСТАВ

Состав набора¹ указан в таблице 1.

Таблица 1

Состав набора			
Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
Смесь-1 MG (Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ)	0,48	1 пробирка	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-голубого цвета
Смесь-2 В (Буферный раствор с сульфатом магния, термостабильной ДНК-полимеразой)	0,48	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ВК U (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с ДНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК U (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с фрагментом ДНК <i>M. genitalium</i>)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	—	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	—	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	—	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

¹ Набор упакован в полиэтиленовый пакет с застёжкой Zip-Lock.

² В случае отсутствия доступа к Интернету обратитесь в службу технической поддержки по телефону (495) 374-13-46 для запроса о предоставлении бумажной версии паспорта.

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.

3 ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследование с помощью набора проводится методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Детекция продуктов ПЦР и раздельное выявление ДНК *M. genitalium* и внутреннего контроля (ВК) обеспечивается применением в реакционной смеси для ПЦР флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, сигналы от которых регистрируются по различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 2).

Таблица 2

Каналы детекции мишеней		
Канал детекции сигнала от флуорофора	Мишень	Область амплификации
ROX	ДНК <i>M. genitalium</i>	<i>pdhD</i> gene
Sy5	ДНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность

Линейная зависимость между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (порогового цикла, Ct) позволяет определять концентрацию ДНК *M. genitalium* в образце относительно положительного контроля ПК U (образца с известной концентрацией ДНК-мишени), который проходит этап экстракции ДНК и ПЦР одновременно с исследуемыми образцами. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций ПК U и полученными значениями Ct для ПК U и исследуемых образцов.

3.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК U

Концентрация клонированного фрагмента ДНК *M. genitalium* в ПК U составляет $5 \lg \pm 0,5 \lg$ копий/мл. Концентрация определяется с помощью установленной производителем методики выполнения измерений на основе метода лимитирующих разведений [2, 3].

4 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518);
- дозаторы переменного объема, механические или электронные, с возможностью дозирования от 5 до 200 мкл (РУ № ФСР 2009/05681);
- программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСЗ 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH; РУ № ФСЗ 2010/07595));

- штатив для пробирок объемом 0,2 и 1,5 мл;
- холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С;
- пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз, при использовании амплификаторов планшетного типа;
- пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз, при использовании амплификаторов роторного типа;
- пробирки объемом 1,5 мл, одноразовые, свободные от ДНКаз, для приготовления реакционной смеси;
- наконечники для дозаторов переменного объема, с фильтром, объемом до 10, 100 и 200 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз;
- ёмкость для сброса использованных материалов;
- перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Класс потенциального риска применения набора (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ № 4н от 06.06.2012) – 2Б.

Работа должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований ГОСТ Р 52905 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов исследования.
- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.
- Утилизировать реагенты (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения) в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических

(профилактических) мероприятий» к утилизации медицинских отходов класса Г.

- Не открывать пробирки с продуктами амплификации в процессе их сбора и утилизации.

- Утилизировать внешнюю упаковку набора, инструкцию по применению и краткое руководство в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 к утилизации медицинских отходов класса А.

- Утилизировать биологический материал, а также расходные материалы и инструменты, загрязнённые биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 к утилизации медицинских отходов класса Б.

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию, указанному в таблице 1.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром.

- Использовать защитную одежду в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Все операции проводить только в одноразовых неопудренных перчатках для исключения контакта с организмом человека.

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

Реагенты, входящие в состав набора, содержат натрия азид в концентрации не более 0,05 %, поэтому не классифицируются как опасные для здоровья человека и окружающей среды. При контакте немедленно промыть поражённое место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

Использование набора по назначению и соблюдение вышеперечисленных мер предосторожности исключает негативное воздействие на организм человека.

6 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Набор предназначен для исследования только биологического материала, указанного в разделе 1. Взятие исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с:

- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»;

- МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории»;

- требованиями, перечисленными в таблицах 3 и 4.

Требования к взятию и предварительной обработке исследуемого материала**Взятие мазков со слизистой оболочки влагалища**

Взятие материала провести с помощью стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А5 универсальный» или «Зонд тип А1 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).

Взятие соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

Взятие материала провести с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощётки (например, «Зонд тип F3 комбинированный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) или стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А1 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).

Взятие соскобов эпителия со слизистой оболочки уретры

Взятие материала провести с помощью стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А3 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).

Взятие секрета предстательной железы

Собрать секрет простаты в количестве от 0,5 до 1 мл в специальную одноразовую ёмкость. При невозможности получить секрет сразу после массажа простаты, собрать первую порцию мочи, в которой содержится секрет предстательной железы, в количестве от 15 до 25 мл и провести её предобработку согласно порядку предобработки мочи.

Взятие и предобработка мочи

Отобрать первую порцию утренней мочи в количестве от 15 до 25 мл в специальную одноразовую ёмкость.

Предобработка:

Взболтать ёмкость с мочой. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку. Центрифугировать 5 мин при 10000 x g. Не захватывая осадок, полностью удалить супернатант, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник без фильтра для каждого образца. При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в 1 мл физиологического раствора стерильного, затем снова концентрировать центрифугированием и удалить супернатант, не захватывая осадок.

К осадку добавить 200 мкл физиологического раствора стерильного. Тщательно перемешать содержимое на вихре.

Таблица 4

Требования к условиям транспортирования и хранения исследуемого материала

Условия транспортирования	Условия хранения
Исследуемые материалы, помещённые в транспортную среду	
Согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается однократное замораживание материала.	
Секрет предстательной железы	
При температуре от 2 °С до 8 °С	• При комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) не более 6 ч;

Условия транспортирования	Условия хранения
	• При температуре от 2 °С до 8 °С не более суток; • При температуре минус 20 °С не более недели; • При температуре минус 70 °С длительно; • Допускается однократное замораживание материала.
	Моча
При температуре от 2 °С до 8 °С	До и после предобработки: • при температуре от 2 °С до 8 °С не более суток; • при температуре минус 20 °С не более недели; • при температуре минус 70 °С длительно; • Допускается однократное замораживание материала.

7 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

7.1 Экстракция ДНК

Провести экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей с использованием набора реагентов для экстракции ДНК из соответствующих видов биоматериала, например, «ДНК-100» (ООО «Амплик»)³, согласно инструкции по его применению, с учётом требований к объёмам реагентов и образцов, указанных в таблице 5.

Таблица 5

Требования к объёмам реагентов и образцов при экстракции ДНК

Реагент/образец	Объём, мкл	Пробирка/ячейка планшета для проведения экстракции ДНК
ВК U ⁴	10	в каждую пробирку/ячейку
Исследуемый образец ⁵	100	в пробирку/ячейку для образца исследуемого материала
ОК	100	в пробирку/ячейку для отрицательного контроля (ОК)
ПК U	100	в пробирку/ячейку для положительного контроля (ПК)
Реагент для элюции ДНК	100	в каждую пробирку/ячейку

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК U не менее чем в одном повторе. Перед использованием контролей перемешать их и осадить капли на вортексе.

7.2 Подготовка к проведению ПЦР

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

7.2.1 Перемешать содержимое пробирок Смесь-1 MG, Смесь-2 В и осадить капли на вортексе.

7.2.2 Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в отдельную пробирку в объёмах согласно таблице 6. Перемешать и осадить капли на вортексе.

³ В ходе проведения клинических испытаний набор был валидирован с набором реагентов «ДНК-100» (ООО «Амплик»).

⁴ При экстракции с помощью набора реагентов «ДНК-100» (ООО «Амплик») ВК U можно не добавлять, так как внутренний контроль входит в состав Буфера А1.

⁵ Для образцов мочи необходимо провести предобработку согласно разделу 6.

Объёмы компонентов реакционной смеси

Компонент	Объём компонента для одного образца, мкл	Примечание
Смесь-1 MG	5 мкл	При расчёте объёмов реагентов для общего количества исследуемых и контрольных образцов необходимо учитывать запас каждого реагента не менее чем на один образец.
Смесь-2 В	5 мкл	

7.2.3 Отобрать необходимое количество пробирок для проведения ПЦР с ДНК исследуемых образцов и контролей. Промаркировать.

7.2.4 Внести в пробирки по 10 мкл приготовленной реакционной смеси.

7.2.5 Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по 15 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК U).

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

7.3 Проведение ПЦР и детекции

7.3.1. Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 7.

Таблица 7

Программа ПЦР и детекции

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	ROX, Cy5	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.
- 2) При одновременном проведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °C – 15 мин» для экономии времени.
- 3) Детекция может назначаться по другим каналам, помимо указанных, при одновременном проведении в одном приборе нескольких тестов с использованием указанной программы.

7.3.2. Поместить пробирки с реакционной смесью и элюатом в амплификатор и запустить программу.

Примечание – Перед постановкой в амплификатор планшетного типа рекомендуется осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Проверить наличие значений Ct по каналу ROX.

- 8.2 При наличии значений Ct по каналу ROX рассчитать концентрацию ДНК *M. genitalium* согласно формуле (1).

$$C_{\text{ДНК MG}} = \frac{100000}{2^{\Delta Ct}} \quad (1)$$

где $C_{\text{ДНК MG}}$ – концентрация ДНК *M. genitalium*, ГЭ/мл;

ΔCt – разность между значением Ct для исследуемого образца и значением Ct для ПК U по каналу ROX.

Примечание – Коэффициент пересчёта концентрации ДНК *M. genitalium* из копий/мл в ГЭ/мл равен 1.

- 8.3 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 8.

Таблица 8

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Качественное определение ДНК <i>M. genitalium</i>	
По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁶ . По каналу ROX значение Ct отсутствует.	ДНК <i>M. genitalium</i> в образце не выявлена.
По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу ROX определено значение Ct.	В образце выявлена ДНК <i>M. genitalium</i> .
По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналу ROX значение Ct отсутствует.	Невалидный результат
Количественное определение ДНК <i>M. genitalium</i>	
По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного. По каналу ROX значение Ct отсутствует.	ДНК <i>M. genitalium</i> в образце не выявлена.
Рассчитано значение концентрации ДНК <i>M. genitalium</i> , укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК <i>M. genitalium</i> в образце выявлена в концентрации в пределах диапазона измерения набора.
Рассчитано значение концентрации ДНК <i>M. genitalium</i> , не укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК <i>M. genitalium</i> в образце выявлена в концентрации вне пределов диапазона измерения набора.
По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналу ROX значение Ct отсутствует.	Невалидный результат

Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей 9.

⁶ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

Критерии оценки для контролей

Контроль	Норма
ОК	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁷ . По каналу ROX значение Ct отсутствует.
ПК U	По каналам ROX, Cy5 значение Ct определено не больше граничного.

9 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Рекомендации по устранению возможных ошибок, получаемых для исследуемых образцов и контролей в процессе исследования с помощью набора, указаны в таблице 10.

Таблица 10

Рекомендации по устранению ошибок

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для ПК значение Ct по каналу ROX и/или Cy5 отсутствует или определено больше граничного ⁷ .	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК по каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного.	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК по каналу ROX определено значение Ct.	Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации.	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Невалидный результат для исследуемого образца (значение Ct по каналу Cy5 отсутствует или определено больше граничного, по каналу ROX значение Ct отсутствуют).	Некорректное проведение экстракции ДНК. Наличие в образце ингибиторов ПЦР.	Повторить исследование данного исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторное взятие и исследование биологического материала.

10 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

10.1 Контроли, используемые в процессе исследования

Результаты исследования контролей должны соответствовать критериям оценки, указанным в разделе 8.

10.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;
- ПК U для контроля корректного прохождения исследования, а также для количественного определения ДНК *M. genitalium* в биологическом материале человека.

⁷ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

10.1.2 Внутренний контроль

Для контроля качества экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов на результаты амплификации используется экзогенный ВК, который добавляется на этапе экстракции ДНК в каждый исследуемый образец и контроли. Отсутствие результатов амплификации для ВК и одновременно для выявляемого микроорганизма свидетельствует о присутствии ингибиторов ПЦР в образце или некорректном проведении экстракции ДНК.

10.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Для выявления возможной контаминации лаборатории продуктами амплификации, исследуемыми и контрольными образцами рекомендуется раз в месяц исследовать смывы с рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений согласно процедуре, указанной в МУ 1.3.2569-09. При обнаружении контаминации необходимо провести мероприятия по её устранению согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

10.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

Рекомендуется проводить контроль качества выполнения исследований с использованием панелей контрольных образцов, предназначенных для проведения внутреннего и внешнего контроля качества лабораторных исследований по обнаружению и количественному определению ДНК *M. genitalium*, либо сравнительным исследованием с использованием зарегистрированных в РФ наборов реагентов для качественного и количественного определения ДНК *M. genitalium* в биологическом материале методом ПЦР.

11 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА^{*}

11.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора составляет 800 ГЭ ДНК *M. genitalium* в 1 мл исследуемого материала (95 % ДИ: 466–1160 ГЭ/мл) для всех заявленных видов биологического материала.

11.2 Диапазон измерения и предел измерения

Диапазон измерения составляет от 1600 до 100000000 ГЭ ДНК *M. genitalium* в 1 мл исследуемого материала для всех заявленных видов биологического материала. Предел измерения набора совпадает с нижней границей диапазона измерения набора.

11.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 11, геномной ДНК человека, а также ДНК

^{*} Заявленные аналитические характеристики набора, кроме аналитической специфичности, проверены с использованием стандартного образца предприятия, содержащего вектор со специфической последовательностью ДНК *M. genitalium*.

M. genitalium. ДНК микроорганизмов в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК *M. genitalium*. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 11

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Наименование	Наименование	Наименование
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria flava</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CMV
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	HSV 1 типа
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	HSV 2 типа
<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Treponema pallidum</i>	HPV

11.3.1 Потенциально интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующие вещества (ингибиторы ПЦР) и их максимальные концентрации в образце, для которых оценивалось их ингибирующее влияние на ПЦР, перечислены в таблице 12.

Таблица 12

Потенциально интерферирующие вещества

Исследуемый материал	Интерферент	Активный компонент	Тип интерферента	Концентрация вещества в образце	Обоснование исследованной концентрации
Мазки со слизистой оболочки влагалища, соскобы эпителия со слизистых оболочек цервикального канала, уретры	Цельная кровь	–	Эндогенная субстанция	5 % v/v	Объем в образце в условиях «наихудшего случая»
	Муцин	Очищенный белок		150 мкг/мл	
Моча (осадок первой порции)	Альбумин	Белок	Эндогенная субстанция	500 мг/л	
	Азитромицин	Азитромицин	Антибиотик-азалид	1 мг/мл	
Секрет предстательной железы	Фруктоза	–	Эндогенная субстанция	10 мг/мл	
	Ибупрофен	Ибупрофен	НПВС	300 мкг/мл	

Наличие возможного ингибирующего эффекта оценивалось путём проведения процедуры экстракции ДНК⁹ из модельных образцов биологического материала, в которые добавлялись потенциальные интерференты в концентрациях согласно таблице 12 и стандартный образец предприятия, содержащий ДНК *M. genitalium* в концентрации 2000 копий/мл. Далее с экстрагированными образцами проводили ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» с использованием набора реагентов «Amplitech MG».

⁹ Экстракция проводилась с использованием набора реагентов «ДНК-100» (ООО «Амплик»).

В результате испытаний подтверждено, что влияние исследованных потенциально интерферирующих веществ на ПЦР, проводимую с использованием набора «Amplitech MG», отсутствует.

11.4 Прецизионность измерения

Коэффициент вариации повторяемости CV_p значений концентрации, характеризующий внутрисерийную повторяемость измерений с использованием набора, не превышает 5 %.

Коэффициент вариации воспроизводимости CV_v значений концентрации, характеризующий межсерийную воспроизводимость измерений с использованием набора, не превышает 10 %.

11.5 Правильность измерения

Систематическая погрешность, характеризующая правильность измерения с использованием набора, не превышает 15 %.

11.6 Диагностические характеристики

Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) набора с доверительной вероятностью 95 % указаны в таблице 13.

Таблица 13

Диагностические характеристики

Исследуемый материал	Количество образцов		ДЧ, %	ДС, %
	положит.	отрицат.		
Мазки со слизистой оболочки влагалища	100	103	97,0 – 100	97,1 – 100
Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала	105	100	97,2 – 100	97,0 – 100
Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры	103	101	97,1 – 100	97,1 – 100
Моча (осадок первой порции)	100	100	97,0 – 100	97,0 – 100
Секрет предстательной железы	13	60	79,4 – 100	95,1 – 100

11.7 Корреляция

Корреляция экспериментальных значений концентраций, полученных при исследовании образцов биологического материала с использованием набора реагентов «Amplitech MG» и референтного набора реагентов, представлена на рисунке 1.

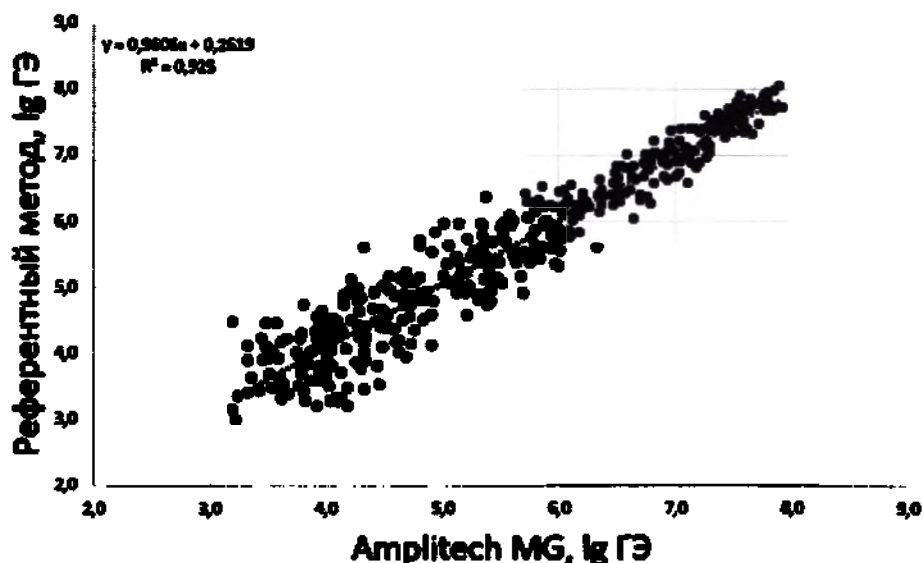


Рисунок 1

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора.

12.2 Хранение

Набор хранить при температуре от 2 °C до 8 °C в защищённом от солнечного света месте.

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

12.3 Транспортирование

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

12.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Повторное применение использованных для исследования реагентов не допускается.

Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 18 °C до 25 °C и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 %.

13 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

Сt	– cycle threshold (пороговый цикл)
ВК	– внутренний контроль
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
ОК	– отрицательный контроль
ПК	– положительный контроль
ПЦР	– полимеразная цепная реакция

14 БИБЛИОГРАФИЯ

1. Гуцин А.Е., Рыжих П.Г., Савочкина Ю.А., Шипулина О.Ю., Шипулин Г.А. Изучение распространенности возбудителей ИППП (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*) с помощью ПЦР в реальном времени в формате «МУЛЬТИПРАЙМ» // Клиническая дерматология и венерология. – 2011. – № 9(4). – С. 90–94.
2. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies // J. Immunology. – 1981. – Vol. 126. – P. 1614–1619.
3. Allen G. Rodrigo, Paul C. Goracke, Kiarash Rowhanian, James I. Mullins. Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays // AIDS research and human retroviruses. – 1997. – Vol. 13 (9). – P. 737–742.

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики *in vitro* для профессионального применения

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования

16 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора направлять в адрес производителя: ООО «Амплитек», 109235, Москва, ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42, тел. (495) 374-13-46, e-mail: support@amplitech.ru.

Сообщения о неблагоприятных событиях (инцидентах), возникших при работе с набором и не указанных в данной инструкции, следует направлять производителю по указанному выше адресу и в уполномоченный регуляторный орган согласно действующему законодательству.

17 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Консультацию по вопросам по работе с набором и его качеству можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: www.amplitech.ru.

18 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Изготовитель



Номер по каталогу



Дата изготовления



Код серии



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Обратитесь к инструкции по применению



Предел температуры



Содержимого достаточно для проведения п тестов



Не допускать воздействия солнечного света



Общество с ограниченной ответственностью «Амплитек»
(ООО «Амплитек»),
Россия, 109235, Москва,
ул. 1-я Курьяновская, д. 34, стр. 8, этаж 1 пом. II ком. 42
тел. (495) 374-13-46, www.amplitech.ru,
e-mail: support@amplitech.ru

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито

20

лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплитек»

А.В. Ходяков



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 20 ЛИСТОВ

«01» сентяб. 2022 год

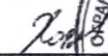
Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавигус П.К.



КОПИЯ
ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплик»

 «АМПА В ХОДАКОВ»

08.07.2022



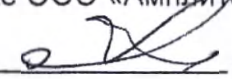
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК MYCOPLASMA GENITALIUM МЕТОДОМ ПЦР С
ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»
(AMPLITECH MG)

Краткое руководство версии 09.06.22

Лист утверждения

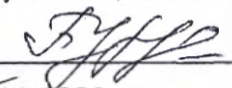
СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплик»

 А.С. Коновалов

09.06.2022

Руководитель отдела разработки
документации ООО «Амплик»

 Д.А. Бурдачёва

09.06.2022

Amplitech MG

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech MG)

КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО

IVD

REF P010-0

LOT xxxx

 96

ВНИМАНИЕ! Перед использованием набора необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* в биологическом материале человека методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Область применения

Набор предназначен для применения в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекций, передаваемых половым путём. Отрицательные результаты исследования с помощью набора не исключают возможность инфицирования *M. genitalium* и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациента. Отрицательные результаты исследования должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Набор может применяться в клинико-диагностических лабораториях.

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

- Мазки со слизистой оболочки влагалища;
- Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, уретры;
- Секрет предстательной железы, моча (осадок первой порции утренней мочи).

РЕАГЕНТЫ

Реагент	Внешний вид	Меры предосторожности
Смесь-1 MG	Прозрачная бесцветная жидкость	Реагенты содержат азид натрия в концентрации не более 0,05 % веществ, поэтому не классифицируются как опасные для здоровья человека и окружающей среды. При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.
Смесь-2 В		
ВК U		
ОК		
ПК U		

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК, ПОДГОТОВКА И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР И ДЕТЕКЦИИ

- 1 Провести экстракцию ДНК с использованием набора реагентов для экстракции ДНК из соответствующих видов биоматериала, например, «ДНК-100» (ООО «Амплитек»), согласно инструкции по его применению, с учётом требований к объёмам реагентов и образцов, указанных ниже:

ВК U ¹	10 мкл	в каждую пробирку/ячейку планшета
Исследуемый образец ²	100 мкл	в пробирку/ячейку планшета для образца исследуемого материала
ОК	100 мкл	в пробирку/ячейку планшета для отрицательного контроля (ОК)
ПК U	100 мкл	в пробирку/ячейку планшета для положительного контроля (ПК)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку/ячейку планшета

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК U не менее чем в одном повторе. Перед использованием контролей перемешать их и осадить капли на вортексе.

- 2 Перемешать содержимое пробирок с реагентами Смесь-1 MG и Смесь-2 В и осадить капли на вортексе.
- 3 Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в отдельную пробирку в объёмах, указанных ниже. Перемешать и осадить капли на вортексе.

Компонент	Объём компонента для одного образца	Примечание
Смесь-1 MG	5 мкл	При расчёте объёмов реагентов для общего количества исследуемых и контрольных образцов необходимо учитывать запас каждого реагента не менее чем на один образец.
Смесь-2 В	5 мкл	

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

- 4 Отобрать необходимое количество пробирок для проведения ПЦР с ДНК исследуемых образцов и контролей (ОК, ПК U). Промаркировать.
- 5 Внести в пробирки по 10 мкл приготовленной реакционной смеси.
- 6 Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по 15 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК, ПК U).

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

- 7 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной ниже:

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с	—	42
	60	20 с	ROX, Cy5	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.
- 2) При одновременном проведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °C – 15 мин» для экономии времени.
- 3) Детекция может назначаться по другим каналам, помимо указанных, при одновременном проведении в одном приборе нескольких тестов с использованием указанной программы.
- 8 Поместить пробирки в амплификатор и запустить программу.

Примечание – Перед постановкой в амплификатор планшетного типа рекомендуется осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

¹ При экстракции с помощью набора реагентов «ДНК-100» (ООО «Амплитек») ВК U можно не добавлять, так как внутренний контроль входит в состав Буфера А1.

² Для образцов мочи провести предобработку согласно инструкции по применению набора для проведения экстракции.

УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ. ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

- 1 Проверить наличие значений Ct по каналу ROX. Каналы детекции мишеней указаны в таблице, приведённой ниже.

Канал детекции

ROX

Cy5

Мишень

ДНК *M. genitalium*

ДНК ВК

- 2 При наличии значений Ct по каналу ROX рассчитать концентрацию ДНК *M. genitalium* согласно формуле (1).

$$C_{\text{ДНК MG}} = \frac{100000}{2^{\Delta Ct}} \quad (1)$$

где $C_{\text{ДНК MG}}$ – концентрация ДНК *M. genitalium*, ГЭ/мл;

ΔCt – разность между значением порогового цикла (Ct) для исследуемого образца и значением Ct для ПК U по каналу ROX.

Примечание – Коэффициент пересчёта концентрации ДНК *M. genitalium* из копий/мл в ГЭ/мл равен 1.

- 3 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблицам, приведённым ниже.

Качественное определение ДНК *M. genitalium*

Значение порогового цикла (Ct) по каналу ROX	Значение порогового цикла (Ct) по каналу Cy5	Интерпретация
отсутствует	≤ 30 (амплификатор роторного типа) ≤ 35 (амплификатор планшетного типа)	ДНК <i>M. genitalium</i> в образце не выявлена.
<u>определено</u>	определено или отсутствует	В образце выявлена ДНК <i>M. genitalium</i> .
отсутствует	> 30 (амплификатор роторного типа) > 35 (амплификатор планшетного типа) или отсутствует	Невалидный результат

Количественное определение ДНК *M. genitalium*

Результат	Интерпретация
По каналу Cy5 значение Ct определено не больше 30 (амплификатор роторного типа)/ 35 (амплификатор планшетного типа). По каналу ROX значение Ct отсутствует. Рассчитано значение концентрации ДНК возбудителя, укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК <i>M. genitalium</i> в образце не выявлена.
Рассчитано значение концентрации ДНК возбудителя, не укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК <i>M. genitalium</i> в образце выявлена в концентрации в пределах диапазона измерения набора.
По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше 30 (амплификатор роторного типа)/ 35 (амплификатор планшетного типа). По каналу ROX значение Ct отсутствует.	ДНК <i>M. genitalium</i> в образце выявлена в концентрации вне пределов диапазона измерения набора.
	Невалидный результат

- 4 Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей, приведённой ниже.

Контроль	Тип амплификатора	Значение порогового цикла (Ct) по каналу	
		ROX	Cy5
ОК	роторный	отсутствует	≤ 30
	планшетный	отсутствует	≤ 35
ПК U	роторный	≤ 31	≤ 30
	планшетный	≤ 35	≤ 35

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито

5
лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплитек»

А.В. Ходяков

