

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»



А.В. Ходяков

08.02.2024

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*, *NEISSERIA*
GONORRHOEAE, *MYCOPLASMA GENITALIUM* И *TRICHOMONAS*
VAGINALIS В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ
ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»
(AMPLITECH CNMT (R)) по ТУ 21.20.23-028-19926214-2023

Инструкция по применению версии 08.02.24

Лист утверждения

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

А.С. Коновалов

08.02.2024

Научный сотрудник отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

А.А. Филичева

08.02.2024

Amplitech CNMT (R)

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech CNMT (R))
по ТУ 21.20.23-028-19926214-2023

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

IVD

REF P018-0

Σ 96

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	4
3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ.....	4
4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ.....	4
5 СОСТАВ.....	4
6 ПРИНЦИП МЕТОДА.....	5
6.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК U.....	6
7 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	6
8 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
9 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	8
10 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	9
10.1 Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции.....	9
10.2 Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР. Проведение ПЦР и детекции.....	11
11 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	12
12 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ.....	14
13 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	14
13.1 Контроли, используемые в процессе исследования.....	14
13.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации.....	15
13.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований.....	15
14 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	15
14.1 Предел обнаружения.....	15
14.2 Диапазон измерения и предел измерения.....	16
14.3 Аналитическая специфичность.....	16
14.4 Прецизионность измерения.....	17
14.5 Правильность измерения.....	17
14.6 Диагностические характеристики.....	17
14.7 Корреляция.....	18
15 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.....	18
15.1 Срок годности.....	18
15.2 Хранение.....	19
15.3 Транспортирование.....	19
15.4 Эксплуатация.....	19
16 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ.....	19
17 БИБЛИОГРАФИЯ.....	19
18 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	20
19 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	21
20 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА.....	21
21 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	21

ВВЕДЕНИЕ

1. Настоящая инструкция по применению версии 08.02.24 распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech CNMT (R)) по ТУ 21.20.23-028-19926214-2023» (далее – набор).

Краткое наименование набора: Amplitech CNMT (R).

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. Микроорганизмы *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* являются основными возбудителями инфекционно-воспалительных заболеваний урогенитального тракта. Для данных микроорганизмов 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 CNMT (R)» позволяет выявлять, дифференцировать и количественно измерять ДНК указанных микроорганизмов в рамках одной реакции.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного и количественного определения ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* 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).

Набор предназначен для лабораторной диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение ДНК *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* и *T. vaginalis*). Применение набора не зависит от популяционных и демографических аспектов.

2 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 *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* 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 клинко-диагностических лабораториях.

3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания к применению набора отсутствуют.

4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ

При применении набора по назначению, в соответствии с данной инструкцией риски и побочные эффекты отсутствуют.

5 СОСТАВ

Состав набора¹ указан в таблице 1.

Таблица 1

Состав набора

Компонент	Номинальный объем, мл	Кол-во	Внешний вид
Планшет со Смесью CNMT (R) (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	—	1 шт.	96-луночный делимый планшет, заклеенный защитной плёнкой, с реагентом в виде геля (от светло-голубого до синего цвета) на дне пробирок

¹ Набор упакован в коробку из картона.

Компонент	Номинальный объем, мл	Кол-во	Внешний вид
Плёнки для планшета	–	2 шт.	Клейкие плёнки
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК U (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами ДНК выявляемых микроорганизмов)	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/

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.

6 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 мишеней (ДНК выявляемых микроорганизмов и внутреннего контроля (ВК)) обеспечивается применением в реакционной смеси для ПЦР флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, сигналы от которых регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 2).

Таблица 2

Каналы детекции мишеней

Канал детекции сигнала от флуорофора	Мишень	Область амплификации
FAM	ДНК <i>C. trachomatis</i>	<i>DnaB-like helicase gene</i>
R6G ³	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	<i>DCMB gene</i>
ROX	ДНК <i>M. genitalium</i>	<i>pdhD gene</i>
Cy5	ДНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность
Cy5.5	ДНК <i>T. vaginalis</i>	<i>G3 hypothetical protein gene</i>

Линейная зависимость между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (порогового цикла, Ct) позволяет определять концентрацию ДНК выявляемых мишеней в образце относительно положительного контроля ПК U (образца с известной концентрацией ДНК-мишеней), 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.

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.

³ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

6.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК U

Концентрация клонированных фрагментов ДНК всех выявляемых микроорганизмов 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].

7 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются оборудование и материалы, указанные в таблице 3.

Таблица 3

Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором

Необходимое оборудование и материалы в случае	
автоматизированной подготовки к проведению ПЦР	ручной подготовки к проведению ПЦР
• Набор реагентов для экстракции ДНК: «ДНК-100 (R)» (форма выпуска 1) (ООО «Амплитек», РУ № РЗН 2023/20090); • Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК; • автоматическая станция пробоподготовки «Amplitech E1» («Амплитек», Россия; РУ № РЗН 2022/16981); • программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446)); • холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; • ёмкость для сброса использованных материалов; • перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.	• Набор реагентов для экстракции ДНК: «ДНК-100 (R)» (форма выпуска 2) (ООО «Амплитек», РУ № РЗН 2023/20090); • Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК; • ПЦР-бокс; • центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518); • дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 20 до 200 мкл (РУ № ФСР 2009/05681); • штатив для ПЦР-планшетов (РУ № ФСЗ 2011/10287); • программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446)); • холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; • наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 20 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз; • ёмкость для сброса использованных материалов; • перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

8 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 и плёнки для планшета (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию 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 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.

9 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 4 и 5.

Таблица 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 вортексе.

Таблица 5

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; • При температуре от 2 °С до 8 °С не более суток; • При температуре минус 20 °С не более недели; • 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; • Допускается однократное замораживание материала.

10 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1 Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

Экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей, а также внесение образцов экстрагированной ДНК в пробирки с реакционной Смесью CNMT (R) провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции ДНК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «ДНК-100 (R)» (ООО «Амплитек»).

10.1.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ОК и ПК U и осадить капли на вортексе.

10.1.2 Подготовить картридж с реагентами из набора «ДНК-100 (R)» и внести в него исследуемые образцы⁴ и контроли согласно инструкции по его применению.

⁴ Для образцов мочи необходимо провести предобработку согласно разделу 9.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК U не менее чем в одном повторе.

10.1.3 Установить на рабочий стол автоматической станции картридж с внесёнными исследуемыми образцами и контролями, а также расходные материалы, входящие в состав набора «ДНК-100 (R)», согласно руководству по эксплуатации станции.

10.1.4 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью CNMT (R) и снять с них защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки использовать реагенты в течение 24 ч.

10.1.5 Установить отрезанные пробирки со Смесью CNMT (R) на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.

ВНИМАНИЕ! Не допускается оставлять реагенты на рабочем столе станции более чем на 24 ч.

10.1.6 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:

а) протокола экстракции ДНК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «ДНК-100 (R)»;

Примечание – В протоколе указать объём элюции 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ПЦР объём элюции не требует ручного ввода, так как уже включён в протокол подготовки к проведению ПЦР.

б) протокола подготовки к проведению ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «Amplitech CNMT (R)».

10.1.7 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech CNMT (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку.

10.1.8 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 6.

Таблица 6

Программа ПЦР и детекции при подготовке к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1»

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	2 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ⁵ , ROX, Cy5, Cy5.5	

⁵ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объем 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.

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

10.2 Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР. Проведение ПЦР и детекции

10.2.1 Провести экстракцию ДНК (с применением автоматической или ручной методики) из исследуемого материала и контролей с использованием формы выпуска 2 набора реагентов «ДНК-100 (R)» (ООО «Амплитек») согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объеме 100 мкл.

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.

10.2.2 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью CNMT (R) и снять с них защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки использовать реагенты в течение 24 ч.

10.2.3 Для удобства внесения образцов ДНК рекомендуется установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов.

10.2.4 Внести в подготовленные пробирки по 20 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.

10.2.5 Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха.

10.2.6 После внесения образцов ДНК заклеить пробирки плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech CNMT (R)».

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку.

10.2.7 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 при ручной подготовке к проведению ПЦР

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	FAM, R6G ⁶ , ROX, Cy5, Cy5.5	

⁶ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

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 °С – 15 мин» для экономии времени.

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

11 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 11.1 Учёт результатов осуществляется с помощью программного обеспечения используемого амплификатора согласно инструкции по его применению. Рекомендуется выставлять пороговую линию на уровне 10 % от разгорания положительного контроля. Кривые флуоресценции, пересекающие пороговую линию, должны иметь сигмообразную форму.
- 11.2 Проверить наличие значений Ct по каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5.
- 11.3 При наличии значений Ct по каналам FAM/R6G/ROX/Cy5.5 рассчитать концентрацию ДНК выявленного возбудителя согласно формуле (1).

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

где $C_{\text{ДНК возб}}$ – концентрация ДНК выявленного возбудителя, копий/мл;
 ΔCt – разность между значением Ct для исследуемого образца и значением Ct для ПК U по каналу FAM/R6G/ROX/Cy5.5.

- 11.4 Рассчитать концентрацию ДНК выявленного возбудителя в геномных эквивалентах в одном миллилитре (ГЭ/мл) согласно формуле (2).

$$C_{\text{ГЭ}} = \frac{C_{\text{ДНК возб}}}{K} \quad (2)$$

где $C_{\text{ГЭ}}$ – концентрация ДНК выявленного возбудителя, ГЭ/мл;
 $C_{\text{ДНК возб}}$ – концентрация ДНК выявленного возбудителя, копий/мл;
 K – коэффициент пересчёта концентрации ДНК возбудителя из копий/мл в ГЭ/мл (см. таблицу 8).

Таблица 8

Коэффициенты пересчёта значений концентрации из копий/мл в ГЭ/мл

Возбудитель	Коэффициент пересчёта
<i>Chlamydia trachomatis</i>	4
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1
<i>Mycoplasma genitalium</i>	1
<i>Trichomonas vaginalis</i>	660

- 11.5 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 9.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат		Интерпретация
Качественное определение ДНК выявляемых возбудителей		
1	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁷ . По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значения Ct отсутствуют.	ДНК <i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> в образце не выявлены.
2	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу FAM определено значение Ct.	В образце выявлена ДНК <i>C. trachomatis</i> .
3	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу R6G определено значение Ct.	В образце выявлена ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> .
4	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу ROX определено значение Ct.	В образце выявлена ДНК <i>M. genitalium</i> .
5	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу Cy5.5 определено значение Ct.	В образце выявлена ДНК <i>T. vaginalis</i> .
6	По двум и более каналам для специфических мишеней (FAM, R6G, ROX, Cy5.5) определено значение Ct.	Интерпретация проводится в соответствии с пп. 2–5. Например: В образце выявлены ДНК <i>C. trachomatis</i> , ДНК <i>T. vaginalis</i> .
7	По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значения Ct отсутствуют.	Невалидный результат
Количественное определение ДНК выявляемых возбудителей		
1	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значения Ct отсутствуют.	ДНК <i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> в образце не выявлены.
2	Рассчитано значение концентрации ДНК возбудителя, укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК возбудителя в образце выявлена в концентрации в пределах диапазона измерения набора.
3	Рассчитано значение концентрации ДНК возбудителя, не укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК возбудителя в образце выявлена в концентрации вне пределов диапазона измерения набора.
4	По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значения Ct отсутствуют.	Невалидный результат

Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей 10.

Таблица 10

Критерии оценки для контролей

Контроль	Норма
ОК	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁷ . По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значение Ct отсутствует.
ПК U	По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 значение Ct определено не больше граничного.

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

12 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Рекомендации по устранению возможных ошибок, получаемых для исследуемых образцов и контролей в процессе исследования с помощью набора, указаны в таблице 11.

Таблица 11

Рекомендации по устранению ошибок

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для ПК значение Ct по каналу FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного ⁸ .	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 FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5.5 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 каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значения 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.
Для исследуемого образца/контролей определено значение Ct, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъёма (график представляет собой приблизительно прямую линию).	Некорректный выбор уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Некорректное проведение ПЦР.	Проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца или, в случае некорректного вида графика для контроля, амплификацию и детекцию для всех исследуемых образцов и контролей.

13 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

13.1 Контроли, используемые в процессе исследования

Результаты исследования контролей должны соответствовать критериям оценки, указанным в разделе 11.

⁸ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

13.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;
- ПК У для контроля корректного прохождения исследования, а также для количественного определения ДНК выявляемых с помощью набора микроорганизмов в биологическом материале человека.

13.1.2 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 выявляемых микроорганизмов свидетельствует о присутствии ингибиторов ПЦР в образце или некорректном проведении экстракции ДНК.

13.2 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.

13.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

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

14 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА⁹

14.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора указан в таблице 12.

Таблица 12

Предел обнаружения		
Мишень	Предел обнаружения, ГЭ/мл	95 %-ый ДИ, ГЭ/мл
ДНК <i>S. trachomatis</i>	200	97 – 270
ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	800	413 – 1445

⁹ Заявленные аналитические характеристики набора, кроме аналитической специфичности, проверены с использованием стандартных образцов предприятия, содержащих векторы со специфическими последовательностями ДНК выявляемых микроорганизмов.

Мишень	Предел обнаружения, ГЭ/мл	95 %-ый ДИ, ГЭ/мл
ДНК <i>M. genitalium</i>	800	432 – 1414
ДНК <i>T. vaginalis</i>	0,75	0,36 – 1,19

14.2 Диапазон измерения и предел измерения

Диапазон измерения и предел измерения набора указаны в таблице 13.

Таблица 13

Диапазон измерения и предел измерения

Мишень	Диапазон измерения, ГЭ/мл	Предел измерения, ГЭ/мл
ДНК <i>C. trachomatis</i>	$4 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^2$
ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	$1,6 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^3$
ДНК <i>M. genitalium</i>	$1,6 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^3$
ДНК <i>T. vaginalis</i>	$1,5 - 1 \cdot 10^6$	1,5

14.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 14, геномной ДНК человека, а также ДНК выявляемых микроорганизмов. ДНК микроорганизмов исследовалась в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл, геномная ДНК человека - в концентрации 1 мкг/мл. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 14

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Наименование	Наименование	Наименование
<i>Candida albicans</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

14.3.1 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 15.

Таблица 15

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	

Исследуемый материал	Интерферент	Активный компонент	Тип интерферента	Концентрация вещества в образце	Обоснование исследованной концентрации
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	

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

14.4 Прецизионность измерения

Коэффициент вариации повторяемости CV_n 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 %.

14.5 Правильность измерения

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

14.6 Диагностические характеристики

Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) набора с доверительной вероятностью 95 % указаны в таблице 16.

Таблица 16

Диагностические характеристики

Исследуемый материал	Мишень	Количество образцов		ДЧ, %	ДС, %
		положит.	отрицат.		
Мазки со слизистой оболочки влагалища	ДНК <i>C. trachomatis</i>	101	301	97,1 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	101	301	97,1 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>M. genitalium</i>	100	302	97,0 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>T. vaginalis</i>	100	302	97,0 – 100	99,0 – 100
Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала	ДНК <i>C. trachomatis</i>	99	306	97,0 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	103	302	97,1 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>M. genitalium</i>	101	304	97,1 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>T. vaginalis</i>	102	303	97,1 – 100	99,0 – 100
Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры	ДНК <i>C. trachomatis</i>	103	300	97,1 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	100	303	97,0 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>M. genitalium</i>	100	303	97,0 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>T. vaginalis</i>	100	303	97,0 – 100	99,0 – 100

Исследуемый материал	Мишень	Количество образцов		ДЧ, %	ДС, %
		положит.	отрицат.		
Моча (осадок первой порции)	ДНК <i>C. trachomatis</i>	103	301	97,1 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	100	304	97,0 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>M. genitalium</i>	101	303	97,1 – 100	99,0 – 100
	ДНК <i>T. vaginalis</i>	100	304	97,0 – 100	99,0 – 100
Секрет предстательной железы	ДНК <i>C. trachomatis</i>	24	112	88,3 – 100	97,4 – 100
	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	24	112	88,3 – 100	97,4 – 100
	ДНК <i>M. genitalium</i>	24	112	88,3 – 100	97,4 – 100
	ДНК <i>T. vaginalis</i>	24	112	88,3 – 100	97,4 – 100

14.7 Корреляция

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

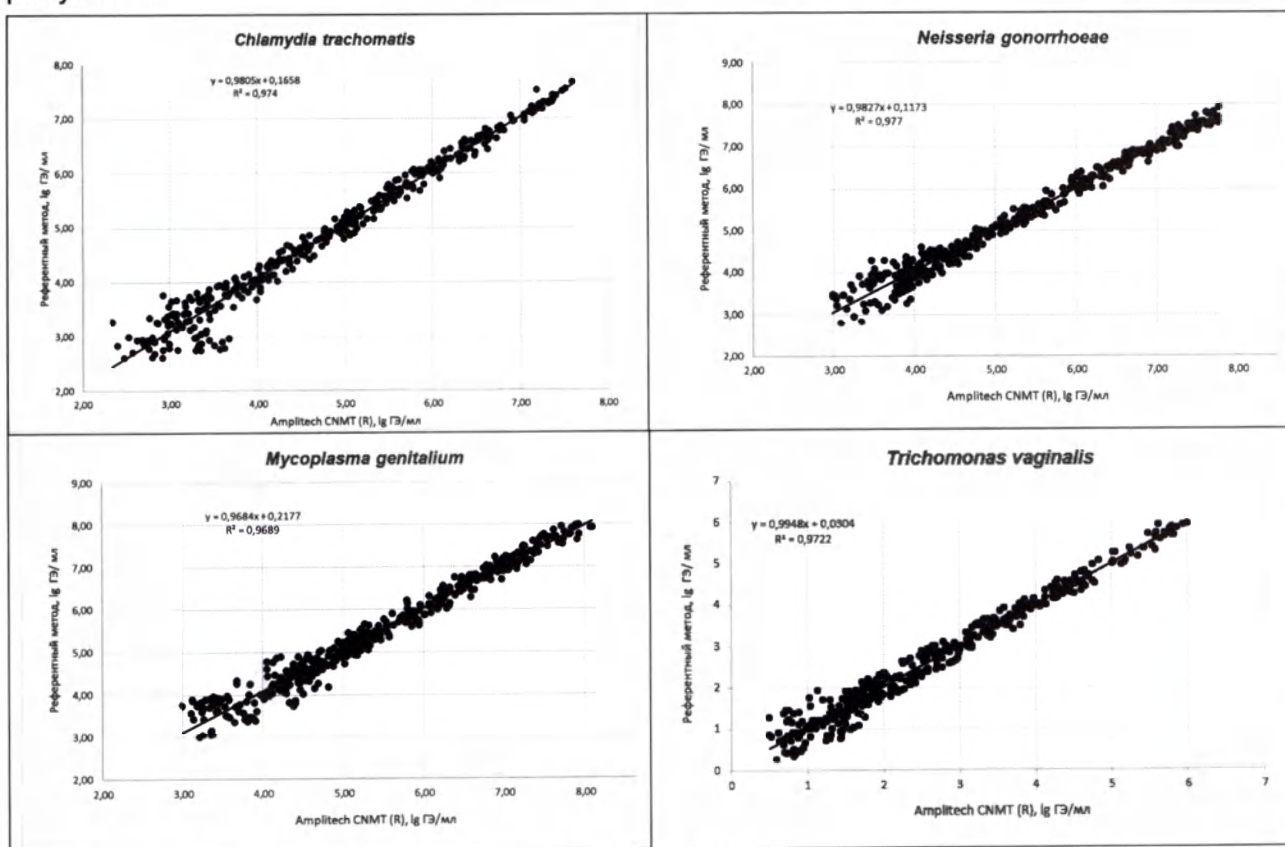


Рисунок 1

15 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

15.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты ПК U, ОК использовать до истечения срока годности набора. После снятия защитной плёнки Смесь CNMT (R) использовать в течение 24 ч.

Не допускается смешивать компоненты наборов разных серий и использовать набор по истечении срока годности.

15.2 Хранение

Набор в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 до 75 % в защищённом от солнечного света месте. Планшет со Смесью CNMT (R) беречь от влаги. После транспортирования допускается хранить набор не более 5 суток при температуре от 8 °С до 25 °С.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Не допускается оставлять реагенты на рабочем столе станции более чем на 24 ч.

15.3 Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 °С до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Допускается транспортировать набор при температуре от 8 °С до 25 °С не более 10 суток.

15.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Пробирки планшета с реагентами предназначены для однократного использования.

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

16 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

Сt	– cycle threshold (пороговый цикл)
в.	– версия
ВК	– внутренний контроль
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаз	– дезоксирибонуклеаза
ОК	– отрицательный контроль
ПК	– положительный контроль
ПЦР	– полимеразная цепная реакция

17 БИБЛИОГРАФИЯ

1. Гущин 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.

18 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 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования

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

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

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

19 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.

20 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

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

21 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Изготовитель



Код серии



Дата изготовления



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по применению



Не допускать воздействия солнечного света



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Не допускать воздействия влаги



Номер по каталогу



Диапазон влажности



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

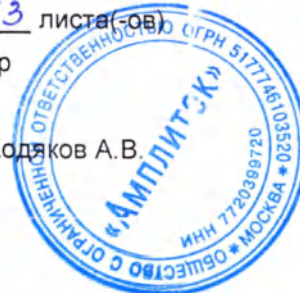
Лист регистрации изменений

[illegible]

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 23 листа(-ов)

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

21 _____ Ходяков А.В.
Подпись



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 23 ЛИСТОВ

28 03 2024 год

Ген. Директор
ООО «ВЫПУСЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

08.02.2024



А.В. Ходяков

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*, *NEISSERIA
GONORRHOЕAE*, *MYCOPLASMA GENITALIUM* И *TRICHOMONAS
VAGINALIS* В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ
ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»
(AMPLITECH CNMT (R)) по ТУ 21.20.23-028-19926214-2023

Краткое руководство версии 08.02.24

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

А.С. Коновалов

08.02.2024

Научный сотрудник отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

А.А. Филичева

08.02.2024

Amplitech CNMT (R)

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech CNMT (R)) по ТУ 21.20.23-028-19926214-2023

КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО

IVD

REF

P018-0

LOT

xxxx



96

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

Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции

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).

Экстракцию ДНК и внесение образцов экстрагированной ДНК в пробирки с реакционной Смесью CNMT (R) провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции ДНК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «ДНК-100 (R)» (ООО «Амплитек»).

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

- 1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ОК и ПК U и осадить капли на вихре.
- 2 Подготовить картридж с реагентами из набора «ДНК-100 (R)» и внести в него исследуемые образцы¹ и контроли согласно инструкции по его применению.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК U не менее чем в одном повторе.

- 3 Установить на рабочий стол автоматической станции картридж с внесёнными исследуемыми образцами и контролями, а также расходные материалы, входящие в состав набора «ДНК-100 (R)», согласно руководству по эксплуатации станции.
- 4 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью CNMT (R) и снять с них защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки использовать реагенты в течение 24 ч.

- 5 Установить отрезанные пробирки со Смесью CNMT (R) на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.

ВНИМАНИЕ! Не допускается оставлять реагенты на рабочем столе станции более чем на 24 ч.

- 6 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:

а) протокола экстракции ДНК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «ДНК-100 (R)»;

Примечание – В протоколе указать объём элюции 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ПЦР объём элюции не требует ручного ввода, так как уже включён в протокол подготовки к проведению ПЦР.

¹ Для образцов мочи провести предобработку согласно инструкции по применению набора для проведения экстракции.

б) протокола подготовки к проведению ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного ниже.



7 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech CNMT (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку.

8 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	2 мин	—	1
3	95	10 с	—	42
	60	20 с	FAM, R6G ² , ROX, Cy5, Cy5.5	

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.

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

Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР. Проведение ПЦР и детекции

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).

Для экстракции ДНК необходимо использовать набор реагентов «ДНК-100 (R)» (ООО «Амплитек»).

1 Провести экстракцию ДНК (с применением автоматической или ручной методики) с использованием набора реагентов «ДНК-100 (R)» (ООО «Амплитек») согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объёме 100 мкл.

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 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью CNMT (R) и снять с них защитную плёнку.

Примечание – После снятия защитной плёнки использовать реагенты в течение 24 ч.

3 Для удобства внесения образцов ДНК рекомендуется установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов.

4 Внести в подготовленные пробирки по 20 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.

5 Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха.

6 После внесения образцов ДНК заклеить пробирки плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech CNMT (R)».

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку.

² Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

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	FAM, R6G ³ , ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объем реакции: 25 мкл.
- 2) При одновременном ведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °C – 15 мин» для экономии времени.

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

Учёт и интерпретация результатов

1 Результаты интерпретировать на основании наличия (отсутствия) Ct (кривых накопления флуоресцентного сигнала, пересекающих пороговую линию) по детектируемым каналам в соответствии с таблицей:

Наличие Ct по каналу для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5.5
Выявлена ДНК	<i>C. trachomatis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>T. vaginalis</i>

Примечание – В случае отсутствия ДНК *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* и *T. vaginalis* в исследуемом образце необходимо проверить наличие Ct по каналу **Cy5** со значением **Ct ≤ 35**. В противном случае результат считать **невалидным**.

2 Количественное определение ДНК выявляемых возбудителей рассчитать с помощью алгоритма, приведенного в инструкции к набору реагентов.

3 Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей, приведённой ниже:

Образец	Граничное значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
ОК	—	—	—	≤ 35	—
ПК U	≤ 34	≤ 35	≤ 35	≤ 35	≤ 35

³ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито

5 (пять)

лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплитек»

21 А.В. Ходяков





ООО «Амплицек»

Россия, 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

АМПЛИТЕК

ПАСПОРТ № 801-24

Amplitech CNMT (R)

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech CNMT (R)) по ТУ 21.20.23-028-19926214-2023

REF P018-0

LOT 0801

2024-02-12

2025-02-12

Условия транспортирования:

при температуре от 2 °С до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Допускается транспортировать набор при температуре от 8 °С до 25 °С не более 10 суток.

Условия хранения:

в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 до 75 % в защищенном от солнечного света месте. Планшет со Смесью CNMT (R) беречь от влаги. После транспортирования допускается хранить набор не более 5 суток при температуре от 8 °С до 25 °С.

Контроль качества набора проведен по ТУ 21.20.23-028-19926214-2023.

Состав набора и внешний вид компонентов

Лот компонента	Норма			Результат контроля
	наименование	количество	внешний вид	
00005	Планшет со Смесью CNMT (R)	1 шт.	96-луночный делимый планшет, заклеенный защитной пленкой, с реагентом в виде геля (от светло-голубого до синего цвета) на дне пробирок	Соответствует
00060	Пленки для планшета	2 шт.	Клейкие пленки	Соответствует
00037	ОК	0,8 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
00013	ПК U	0,8 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
—	Инструкция по применению	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/	Соответствует
—	Краткое руководство	1 шт.	В бумажном виде	Соответствует
—	Паспорт	1 шт.	В электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/	Соответствует

Упаковка набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Вид первичной и вторичной упаковки	Соответствует требованиям ТУ.	Соответствует
Отсутствие видимых дефектов	Отсутствие дефектов	Соответствует

Маркировка набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Наличие информации на внутренней упаковке компонентов набора и внешней упаковке набора в соответствии с требованиями ТУ	Информация соответствует требованиям ТУ.	Соответствует

Функциональные характеристики набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Предел обнаружения		
Выявление ДНК в концентрации: <i>S. trachomatis</i> – 200 ГЭ/мл; <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> – 800 ГЭ/мл; <i>T. vaginalis</i> – 0,75 ГЭ/мл.	ДНК <i>S. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> обнаружены.	Соответствует

Показатель	Норма	Результат контроля
Валидность результатов тестирования для исследуемых образцов	Последовательность ВК ¹ обнаружена.	Соответствует
Валидность результатов тестирования для контролей исследования (ОК, ПК)	Результаты соответствуют критериям оценки, указанным в инструкции по применению набора.	Соответствует
Предел измерения		
Количественное определение ДНК в концентрации ² : <i>S. trachomatis</i> – 1300 ГЭ/мл; <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> – 5100 ГЭ/мл; <i>T. vaginalis</i> – 4,75 ГЭ/мл.	Полученное расчётное значение концентрации ДНК в диапазоне: <i>S. trachomatis</i> – от 400 до 4000 ГЭ/мл; <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> – от 1600 до 16000 ГЭ/мл; <i>T. vaginalis</i> – от 1,5 до 15 ГЭ/мл.	Соответствует
Валидность результатов тестирования для исследуемых образцов	Последовательность ВК обнаружена.	Соответствует
Валидность результатов тестирования для контролей исследования (ОК, ПК)	Результаты соответствуют критериям оценки, указанным в инструкции по применению набора.	Соответствует

Заключение: Набор указанного лота соответствует требованиям ТУ 21.20.23-028-19926214-2023.

Дата выдачи паспорта: 13.02.2024

Руководитель ОКК, Романенкова Е.С.

Романенкова Е.С.
по приказу 1024 от 06/01/2024
от 06 февраля 2024 года



¹ Реагент входит в состав набора реагентов для проведения экстракции ДНК.

² Нижняя граница диапазона измерения набора плюс 0,5 lg.

Пронумеровано, скреплено и прошито

2 (два)
лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Ампитек»

А.В. Ходяков

