

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

« 28 » марта 2024.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

для выявления ДНК *Mycoplasma genitalium*

в клиническом материале методом

полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	9
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	11
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	12
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК ⁷	21
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	22
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	23
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	23
ФОРМАТ FER	26
СОСТАВ	26
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	26
А. Подготовка проб для амплификации	26
Б. Проведение амплификации	28
В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»	29
Г. Интерпретация результатов	29
ФОРМАТ FRT	32
СОСТАВ	32
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	33
А. Подготовка пробирок для проведения амплификации	33
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	35
В. Анализ и интерпретация результатов	36
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	40
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	41
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	42

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
FER	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FL	- ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
<i>M. genitalium</i>	- <i>Mycoplasma genitalium</i>

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL» предназначен для качественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* в биологическом материале (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры), прямой кишки, ротоглотки; моча (первая порция); секрет предстательной железы) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекций, передаваемых половым путем, вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL¹) и одновременной амплификации участков ДНК выявляемого микроорганизма и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Амплификация участка ДНК проводится при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК-мишеней, что позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала либо с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», либо с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора после окончания ПЦР (детекция по «конечной точке»).

Формат FRT форма 2 набора реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения

¹ ВКО-FL входит в состав комплектов реагентов, рекомендованных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для экстракции ДНК из исследуемого материала. В состав «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL» реагент ВКО-FL не включен.

фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводится амплификация двух ДНК-мишеней. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК ВКО-FL
Область амплификации	gyrB gene	искусственная нуклеотидная последовательность

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Набор реагентов выпускается в 2 форматах.

Формат FEP

● **Форма 1:** «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл)

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл)

Формат FEP формы 1 и 2 рассчитаны на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли, и используются для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Формат FRT

● **Форма 1:** «ПЦР-комплект» вариант FRT

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Формат FRT формы 1 и 2 рассчитаны на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли, и используются для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры)	«Транспортная среда с муколитиком (TCM)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	1x10 ³
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-100 F	
	ТС-ЭДЭМ	«ЭДЭМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP (пробирки 0,5 мл), FEP (пробирки 0,2 мл), FRT, FRT-100 F	
Отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	«Транспортная среда с муколитиком (TCM)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP (пробирки 0,5 мл), FEP (пробирки 0,2 мл), FRT, FRT-100 F	1x10 ³
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-100 F	
Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	«Транспортная среда с муколитиком (TCM)»	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP (пробирки 0,5 мл), FEP (пробирки 0,2 мл), FRT, FRT-100 F	1x10 ³
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-100 F	
	ТС-ЭДЭМ	«ЭДЭМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP (пробирки 0,5 мл), FEP (пробирки 0,2 мл), FRT, FRT-100 F	
Моча	—	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	2x10 ³

Вид исследуемого материала	Транспортная среда	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-100 F	1x10 ⁴
		«ЭДЭМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP (пробирки 0,5 мл), FEP (пробирки 0,2 мл), FRT, FRT-100 F	
Секрет предстательной железы	—	«ДНК-сорб-АМ»	«ПЦР-комплект» варианты FEP (пробирки 0,5 мл), FEP (пробирки 0,2 мл), FRT, FRT-100 F	1x10 ³
		«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	«ПЦР-комплект» варианты FRT, FRT-100 F	

Примечание – Концентрация геномных эквивалентов (ГЭ) указана в 1 мл мочи или секрета предстательной железы или в пересчете на 1 мл транспортной среды, содержащей мазок/соскоб.

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

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК *Mycoplasma genitalium*. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов/штаммов, а также геномной ДНК человека:

- Штаммы из коллекции ATCC® (American Type Culture Collection, США): *Mycoplasma genitalium* (ATCC® 49123™) в концентрации не менее 1x10³ ГЭ/мл;
- Штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США): *Candida albicans* (ATCC® 14053™); *Candida krusei* (ATCC® 14243™); *Escherichia coli* (ATCC® 25922™ и ATCC® 35218™); *Gardnerella vaginalis* (ATCC® 14018™); HSV (герпесвирус) 1 и 2 типа (ATCC® VR-539DQ™ и ATCC® VR-

540DQ™); *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC® 49926™); *Staphylococcus aureus* (ATCC® 29213™ и ATCC® 25923™); *Streptococcus agalactiae* (ATCC® 12386™ и ATCC® 13813™); *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615™); *Trichomonas vaginalis* (ATCC® 50148™) в концентрации не менее 1×10^3 ГЭ/мл;

- Клинические образцы (видовая принадлежность возбудителей определена с помощью метода прямого секвенирования): *Candida glabrata*; CMV (цитомегаловирус); HPV (вирус папилломы человека); *Lactobacillus* spp.; *Mycoplasma hominis*; *Neisseria flava*; *Neisseria mucosa*; *Neisseria sicca*; *Neisseria subflava*; *Treponema pallidum*; *Toxoplasma gondii*; *Ureaplasma parvum*; *Ureaplasma urealyticum* в концентрации не менее 1×10^4 и не более 1×10^8 ГЭ/мл,
- ДНК человека в концентрации 0,2 мг/мл.

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

Информация об интерферирующих веществах указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой разведение стандартного образца предприятия, содержащего ДНК *Mycoplasma genitalium*, до конечной концентрации 1×10^4 ГЭ/мл. В качестве отрицательного образца был использован реагент ОКО.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Форма комплектации	Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
		Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Формат FRT Форма 1	Положительные	10	100	40	100
	Отрицательные	10	100	40	100
Формат FRT Форма 2	Положительные	10	100	40	100
	Отрицательные	10	100	40	100
Формат FEP Форма 1	Положительные	10	100	40	100
	Отрицательные	10	100	40	100
Формат FEP Форма 2	Положительные	10	100	40	100
	Отрицательные	10	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы следующие образцы (см. табл. 4):

Таблица 4

Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции	Количество образцов
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры)	«ДНК-сорб-АМ»	240
	«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	240
	«ЭДЭМ»	240
Отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	«ДНК-сорб-АМ»	240
	«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	240
Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	«ДНК-сорб-АМ»	240
	«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	240
	«ЭДЭМ»	240
Секрет предстательной железы	«ДНК-сорб-АМ»	240
	«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	240
Моча (первая порция)	«ДНК-сорб-АМ»	240
	«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	240
	«ЭДЭМ»	240
Всего		3120

В качестве референтного метода использовался набор реагентов «АмплиСенс® *N.gonorrhoeae* / *C.trachomatis* / *M.genitalium* / *T.vaginalis*-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» (ПУ № ФСР 2009/06060).

Результаты представлены в табл. 5 и 6.

Таблица 5

**Результаты тестирования набора реагентов «АмплиСенс®
Mycoplasma genitalium-FL» в сравнении с референтным методом**

Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® Mycoplasma genitalium-FL»		Результаты применения референтного метода	
			Положи- тельных	Отрица- тельных
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры)	Всего исследовано 720 образцов	положительных	360	-
		отрицательных	-	360
Отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	Всего исследовано 480 образцов	положительных	240	-
		отрицательных	-	240
Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	Всего исследовано 720 образцов	положительных	360	-
		отрицательных	-	360
Моча (первая порция)	Всего исследовано 720 образцов	положительных	360	-
		отрицательных	-	360
Секрет предстательной железы	Всего исследовано 480 образцов	положительных	240	-
		отрицательных	-	240

Таблица 6

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиСенс® Mycoplasma genitalium-FL»**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ² (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры)	100 (98,98-100) %	100 (98,98-100) %
Отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	100 (98,47-100) %	100 (98,47-100) %
Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	100 (98,98-100) %	100 (98,98-100) %
Моча (первая порция)	100 (98,98-100) %	100 (98,98-100) %
Секрет предстательной железы	100 (98,47-100) %	100 (98,47-100) %

² Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

³ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», 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» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по

окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

● Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку⁴, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять 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».

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Транспортная среда для транспортирования и хранения исследуемого биологического материала, содержащая консервант - «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ПУ № ФСР 2009/05514) или транспортная среда ТС-ЭДЭМ в

⁴ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

составе комплекта реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» (РУ № ФСР 2010/07828)).

2. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор).
3. Щетка эндоцервикальная.
4. Зонд для взятия исследуемого биологического материала, однократного применения, стерильный.
5. Емкость для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, однократного применения, стерильная.
6. Вакуумная пробирка для мочи со стабилизатором.
7. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 и 5,0 мл.

Предварительная подготовка исследуемого материала

8. Транспортная среда ТС-ЭДЭМ в составе комплекта реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» (РУ № ФСР 2010/07828).
9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
10. Завинчивающиеся крышки к пробиркам.
11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром и без фильтра до 100, до 200 и до 1000 мкл.
12. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
13. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g.
14. Центрифуга-вортекс.
15. Бокс микробиологической безопасности II класса защиты.
16. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
17. Автоматические дозаторы переменного объема.
18. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
19. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
20. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

21. Комплект реагентов для экстракции ДНК (в зависимости от типа исследуемого материала, см. раздел инструкции «Проведение ПЦР-исследования», подраздел «Экстракция

ДНК из исследуемых образцов») - «ДНК-сорб-АМ» (РУ № ФСР 2007/00183), «ЭДЭМ» (РУ № ФСР 2010/07828) или «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО» (РУ № РЗН 2016/3920).

22. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК - согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот – при работе с форматом FRT:

23. Комплект реагентов для экстракции ДНК на автоматической станции «открытого типа» (например, «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО» (РУ № РЗН 2016/3920)).

24. Автоматическая станция для экстракции РНК/ДНК «открытого типа» (например, KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific Oy («Термо Фишер Сайентифик Ой»), Финляндия (РУ № ФСЗ 2009/05562)), Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. (ООО «Ханчжоуская компания инструментов Аошэн»), Китай (РУ № РЗН 2022/16430))).

25. Набор необходимых расходных материалов к используемой автоматической станции.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

26. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл и 200 мкл.

27. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).

28. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс, УФ-бокс) или бокс микробиологической безопасности II класса защиты.

29. Центрифуга-вортекс.

30. Автоматические дозаторы переменного объема.

31. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

32. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.

33. Емкость для сброса наконечников.

При проведении детекции по «конечной точке»:

34. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01275)), MaxyGene Gradient (Axygen Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Group of The Applera Corporation,

Сингапур)).

35. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (SIA BioSan, Латвия), «Джин»/«Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01274, РУ № ФСР 2007/01249))).

При детекции в режиме «реального времени»:

36. Одноразовые полипропиленовые пробирки – при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F:

- а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;
- б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – при использовании прибора планшетного типа;
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа.

37. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториес, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)), ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2007/01250, РУ № ФСР 2011/10229))).

38. ПО для запуска амплификации и автоматической обработки результатов AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) версии 1.0.0 или выше.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА⁵

Материалом для исследования служат:

- отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со

⁵ см. также «Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики: методические рекомендации» / Домонова Э.А., Творогова М.Г., Подколзин А.Т. [и др.]. Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, 2021. 112 с. ISBN 978-5-6045286-6-2, DOI: <https://doi.org/10.36233/978-5-6045286-6-2>, веб-сайт <https://prepcr.crie.ru/>

слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры),

- отделяемое слизистой оболочки ротоглотки,
- отделяемое слизистой оболочки прямой кишки,
- моча (первая порция),
- секрет предстательной железы.

ВНИМАНИЕ! При применении комплекта реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» взятие клинического материала (кроме мочи) производится только в пробирки с транспортной средой ТС-ЭДЭМ, входящей в состав комплекта реагентов. Комплект реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» используется при проведении первичного скрининга пациентов и не предназначен для контроля после проведенного лечения.

ВНИМАНИЕ! В случае использования транспортной среды «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» цвет жидкости может измениться при кислом pH.

Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта:

Отделяемое слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести из заднебокового свода влагалища. Рабочей частью зонда вращательным движением провести по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая отделяемое. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Перенести зонд в пробирку с 0,5 мл транспортной среды. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда в транспортную среду и, прижав её к внутренней стороне пробирки, вращать 5–10 с, после чего зонд удалить, пробирку плотно закрыть.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Соскоб со слизистой оболочки цервикального канала

Доступ к цервикальному каналу необходимо обеспечить с помощью одноразового или многоразового стерильного гинекологического зеркала. Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном (допустимо

минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови). Взятие материала провести с помощью эндоцервикальной щётки (цитощётки) или зонда гинекологического комбинированного (допускается использование при обследовании беременных, молодых нерожавших женщин).

Способы взятия соскобов эпителиальных клеток:

- Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс), взятый одной цитощёткой, и/или соскоб эпителия с поверхности шейки матки (эктоцервикс), взятый второй цитощёткой, поместить в пробирку с транспортной средой.
- Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс и эктоцервикс), взятый комбинированным гинекологическим зондом, поместить в пробирку с транспортной средой.

Рабочую часть цитощётки/зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки.

В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть цитощётки/зонда в транспортную среду и, прижав её к внутренней стороне пробирки, вращать 5–10 с, после чего цитощётку/зонд удалить. Пробирку плотно закрыть крышкой.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части цитощётки/зонда!

Отделяемое слизистой оболочки уретры

У **женщин** перед взятием соскоба из уретры обработать наружное отверстие уретры тампоном, смоченным стерильным 0,9% раствором натрия хлорида для удаления отделяемого из влагалища. Ввести рабочую часть зонда в уретру на глубину 1–2 см, несколькими вращательными движениями собрать отделяемое. Допустимо присутствие примесей в виде слизи и крови.

У **мужчин** перед взятием соскоба из уретры обработать головку полового члена в области наружного отверстия уретры тампоном, смоченным стерильным 0,9% раствором натрия хлорида. Произвести массаж уретры. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удалить их сухим тампоном. Ввести рабочую часть зонда в уретру на глубину 1–2 см, несколькими вращательными движениями собрать отделяемое. Допустимо присутствие примесей в виде слизи, крови и гноя.

Перенести зонд в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стороне пробирки, вращать 5–10 с, после чего зонд удалить, пробирку плотно закрыть.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда!

Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки

Рабочей частью зонда-тампона провести вращательными движениями по поверхности миндалин, нёбных дужек и задней стенки ротоглотки. Перенести зонд-тампон в пробирку с 0,5 мл транспортной среды. Рабочую часть зонда-тампона, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда-тампона в транспортную среду и, прижав её к внутренней стороне пробирки, вращать 5–10 с, после чего зонд удалить, пробирку плотно закрыть.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда-тампона!

Допускается хранение образцов отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, взятых в транспортную среду, до проведения ПЦР-исследования:

При использовании «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)»:

- при температуре от 18 до 25 °С — в течение 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С — в течение 3 месяцев;
- при температуре от минус 20 °С и ниже — длительно.

При использовании «Транспортная среда ТС-ЭДЭМ» из набора реагентов для экстракции ДНК экспресс методом «ЭДЭМ»:

- при температуре от 18 до 25 °С — в течение 2 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С — в течение 14 суток;
- при температуре от минус 20 °С и ниже — длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Отделяемое слизистой оболочки прямой кишки

Провести тщательный туалет области вокруг анального отверстия с водой и мылом. Ввести зонд-тампон в анальное отверстие на глубину 3–4 см. Рабочей частью зонда-тампона вращательным движением провести по поверхности боковых стенок анального (заднепроходного) канала и преддверия прямой кишки, максимально полно собирая отделяемое. Допустимо умеренное присутствие примесей в виде слизи, крови, гноя и каловых масс. Перенести зонд-тампон в пробирку с 0,5 мл транспортной среды. Рабочую часть зонда-тампона, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой. Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания погрузить рабочую часть зонда-тампона в транспортную среду и, прижав её к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5–10 с, после чего зонд удалить, пробирку плотно закрыть.

Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части зонда-тампона!

Допускается хранение и транспортирование образцов отделяемого слизистой оболочки прямой кишки, взятых в «Транспортную среду с муколитиком (ТСМ)», до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре от минус 20 °С и ниже – длительно.

Моча (первая порция)

Сбор мочи провести после тщательного туалета наружных половых органов.

У женщин перед сбором материала желательно закладывать тампон во влагалище для предупреждения контаминации мочи отделяемым из влагалища.

У мужчин при мочеиспускании необходимо, полностью оттянув кожную складку, освободить наружное отверстие мочеиспускательного канала.

Для исследования отобрать первую порцию утренней мочи в объёме 15–30 мл в контейнер, плотно закрыть крышкой.

При использовании для хранения и транспортировки вакуумной пробирки для мочи со стабилизатором: образец мочи перемешать переворачиванием в исходной ёмкости, вставить крышку вакуумной пробирки в устройство для отбора

(иглу держателя). Надавить, чтобы игла устройства/держателя проколола крышку пробирки (крышку с пробирки не снимать!), наполнить пробирку и затем вынуть ее из устройства/держателя. Пробирку перевернуть 6–8 раз для тщательного перемешивания мочи со стабилизатором.

Допускается хранение и транспортирование нативных образцов мочи до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С — в течение 1-2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С — в течение 1 суток;
- при температуре от минус 20 °С и ниже — в течение 7 суток;
- при температуре не выше минус 68 °С — длительно.

Допускается хранение образцов мочи, взятых в вакуумные пробирки, до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С — в течение 8 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С — в течение 2 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С — в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С — длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Секрет предстательной железы

Перед получением секрета простаты головку полового члена обработать тампоном, смоченным 0,9% раствором натрия хлорида. Взятие секрета простаты произвести после предварительного массажа предстательной железы врачом. После окончания массажа предстательной железы её секрет в объёме не менее 0,5–1,0 мл собрать в пробирку или контейнер, плотно закрыть крышкой.

При невозможности получить секрет сразу после массажа предстательной железы собирают первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в объёме 15–25 мл (см. правила сбора мочи).

Допускается хранение и транспортирование образцов секрета предстательной железы до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С — в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С — в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С и ниже — в течение 7 суток;
- при температуре не выше минус 68 °С — длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК⁵

Образцы отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемого слизистой оболочки влагалища, соскоба со слизистой оболочки цервикального канала, отделяемого слизистой оболочки уретры), ротоглотки, прямой кишки и секрета предстательной железы не требуют предварительной подготовки.

Образцы мочи требуют предварительной подготовки.

Предобработка мочи

Предварительная обработка образцов мочи для последующей экстракции ДНК с помощью комплектов реагентов «ДНК-сорб-АМ» и «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»

Образец мочи перемешать в исходной ёмкости. Перенести 1 мл материала в пробирку объёмом 1,5 мл, используя наконечник с фильтром. Центрифугировать 5 мин при 10 тыс. g. (12 тыс. об/мин). Удалить супернатант, используя наконечник без фильтра и отсасыватель медицинский, оставив 100 мкл надосадочной жидкости и осадок. Полученный образец использовать для экстракции ДНК.

Допускается хранение образцов осадка мочи до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °C — в течение 1 суток;
- при температуре от минус 20 °C и ниже — в течение 7 суток;
- при температуре не выше минус 68 °C — длительно.

Предварительная обработка образцов мочи для последующей экстракции ДНК с помощью комплекта реагентов «ЭДЭМ»

Образец мочи перемешать в исходной ёмкости. В пробирку с транспортной средой ТС-ЭДЭМ (0,5 мл) внести 1 мл мочи, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. Центрифугировать 5 мин при 10 тыс. g. (12 тыс. об/мин). Не затрагивая осадок, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра. Добавить в каждую пробирку с осадком мочи 0,5 мл ТС-ЭДЭМ. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе, чтобы

ресуспендировать осадок, и осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки кратким центрифугированием при 1,5-3 тыс об/мин в течение 2-3 с. Полученный образец использовать для экстракции ДНК.

Допускается хранение образцов осадка мочи в транспортной среде ТС-ЭДЭМ:

- при температуре от 18 до 25 °С — в течение 2 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С — в течение 14 суток;
- при температуре от минус 20 °С и ниже — длительно.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО-FL, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Ограничения по использованию проб

Непригодными для исследования являются образцы биологического материала при нарушении условий взятия, хранения и транспортировки.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и/или экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале, используемом для исследования (см. табл. 7).

Были протестированы модельные образцы отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры), ротоглотки, прямой кишки; мочи; секрета предстательной железы без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 7.

В модельные образцы добавляли также стандартный

образец предприятия, содержащий ДНК *M. genitalium*, до концентрации 1×10^4 ГЭ/мл.

Таблица 7

Вид исследуемого материала	Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Комплект для экстракции	Наличие интерференции
Моча	Эндогенные вещества	Альбумин	500 мг/л	«ДНК-сорб-АМ», «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО», «ЭДЭМ»	Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Азитромицин	1,0 мг/мл		Не обнаружено
Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	Эндогенные вещества	Муцин	150 мкг/мл		Не обнаружено
		Гемоглобин	300 мкг/мл		Не обнаружено
	Экзогенные вещества	«Contex Wave» интимный гель-смазка, силиконовый	20%		Не обнаружено
		Хлоргексидин	20%		Не обнаружено
Отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	Эндогенные вещества	Слизь	10%		Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Мирамистин®	0,001%		Не обнаружено
		Хлоргексидин	20%		Не обнаружено
Отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	Эндогенные вещества	Цельная кровь	20%	«ДНК-сорб-АМ», «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»	Не обнаружено
		Фекалии	5%		Не обнаружено
	Экзогенные вещества	«Contex Strong» интимный гель-смазка, силиконовый	15%		Не обнаружено
Секрет предстательной железы	Эндогенные вещества	Фруктоза	10 мг/мл		Не обнаружено
	Экзогенные вещества	Ибупрофен	300 мкг/мл		Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» или по «конечной точке»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов, указанные в табл. 8:

Таблица 8

«ДНК-сорб-АМ»	«ЭДЭМ»	«АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»
– отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры); – отделяемое слизистых оболочек прямой кишки; – отделяемое слизистых оболочек ротоглотки; – моча; – секрет предстательной железы	– отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры); – отделяемое слизистых оболочек ротоглотки; – моча	– отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры); – отделяемое слизистых оболочек прямой кишки; – отделяемое слизистых оболочек ротоглотки; – моча; – секрет предстательной железы

Порядок работы с комплектами реагентов «ДНК-сорб-АМ», «ЭДЭМ» и «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»⁶ смотрите в инструкции к соответствующему комплекту для экстракции.

Комплект реагентов «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО» может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»⁷. Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО».

Экстракцию ДНК из каждого исследуемого образца и контролей необходимо проводить в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**. В каждую группу экстрагируемых образцов необходимо включать по одному повтору отрицательного контроля (ОК). Контроль проходит все этапы ПЦР-исследования, начиная с этапа экстракции. ОК позволяет контролировать возможную контаминацию исследуемых образцов.

⁶ Комплект для экстракции «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО» используется с ПЦР-комплектами формата FRT.

⁷ Станции, совместимые с наборами реагентов различных производителей.

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

Объем ВКО-FL – 10 мкл в каждую пробирку (ВКО-FL входит в состав комплекта для экстракции).

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОКО (ОКО входит в состав комплекта для экстракции).

Объем элюции – 100 мкл.

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

ВНИМАНИЕ! ВКО-FL содержится в реагенте ВКО-Дилуэнт и не требует дополнительного внесения в исследуемые образцы и контроли.

Объем исследуемого образца – 100 мкл транспортной среды ТС-ЭДЭМ, содержащей исследуемый образец.

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

Объемы реагентов и образцов при экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО»:

Объем ВКО-FL – 10 мкл в каждую пробирку (ВКО-FL входит в состав комплекта для экстракции).

Объем исследуемого образца – 100 мкл.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОКО (ОКО входит в состав комплекта для экстракции).

Объем элюции – 100 мкл.

ФОРМАТ FER

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FER (пробирки 0,5 мл)

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FER (пробирки 0,2 мл)

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FER – комплект реагентов для амплификации участка ДНК *Mycoplasma genitalium* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL <i>Mycoplasma genitalium</i> раскапана под воск	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,01	110 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость от бесцветного до красного цвета	1,1	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон-red ⁸	Прозрачная жидкость от бесцветного до красного цвета	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ⁹	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

⁸ Реагент используется при исследовании проб ДНК, экстрагированных с помощью комплекта для экстракции «ДНК-сорб-АМ».

⁹ Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и комплектуется только в состав Формы 1.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FL *Mycoplasma genitalium* для образца «Фон», а также для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 6). Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
2. Приготовить образец «Фон». Для этого в пробирку с ПЦР-смесью-1-FL *Mycoplasma genitalium* на поверхность застывшего воска внести 20 мкл ПЦР-смеси-Фон-red. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).

ВНИМАНИЕ! Если экстракция проб ДНК проведена с помощью комплекта реагентов «ЭДЭМ», для приготовления образца «Фон» в пробирку с ПЦР-смесью-1-FL *Mycoplasma genitalium* на поверхность воска внести 10 мкл реагента ПЦР-буфер-Фон (входит в состав комплекта реагентов «ЭДЭМ»), затем внести 10 мкл ДНК пробы отрицательного контроля экстракции (ОК), полученной в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «ЭДЭМ».

ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С в защищенном от света месте и использовать многократно при условии проведения амплификации с набором реагентов той же серии, того же типа ПЦР-пробирок, и экстракции проб ДНК тем же комплектом для экстракции.

3. В пробирки с ПЦР-смесью-1-FL *Mycoplasma genitalium* на поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FL *Mycoplasma genitalium*.
4. Сверху добавить каплю минерального масла для ПЦР при использовании амплификатора без термостатируемой крышки.
5. В подготовленные пробирки (кроме пробирок с образцами «Фон») внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированной с помощью комплекта реагентов для проведения экстракции

методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

6. Поставить контрольные реакции:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ДНК-буфера.**
- б) **положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ПКО комплексного.**
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из отрицательного контроля экстракции.**

Б. Проведение амплификации

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

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

Таблица 9

Программа амплификации «АмплиСенс-1-FEP»

Цикл	«Терцик»			GeneAmp PCR System 2700			MaxyGene Gradient		
	Темпе- ратура, °С	Время	Кол-во циклов	Темпе- ратура, °С	Время	Кол-во циклов	Темпе- ратура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	5 мин	1	95	5 мин	1	95	5 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
5	10	Хранение		10	Хранение		10	Хранение	

3. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

В. Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке»

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

Таблица 10

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК ВКО-FL

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

Г. Интерпретация результатов

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

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 11 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 11

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора	
		FAM	JOE
ОК	Экстракция ДНК	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения
К-	ПЦР	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения
К+	ПЦР	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения

При наличии отклонений результатов для контролей, от указанных выше, интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Принцип интерпретации результатов указан в таблице 12:

Таблица 12

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Флуоресцентный сигнал по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения	ДНК <i>M.genitalium</i> НЕ обнаружена
Выше порогового значения положительного результата	Выше или ниже порогового значения	ДНК <i>M.genitalium</i> обнаружена
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения	Невалидный*
Между пороговыми значениями отрицательного и положительного результата	Выше или ниже порогового значения	Сомнительный**

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

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

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

Возможные ошибки

- Для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора FAM ниже порогового значения положительного результата и/или сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора JOE ниже порогового значения. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, начиная с этапа амплификации.
- Для отрицательного контроля экстракции (ОК):
 - а) сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора FAM выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами

амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК исследуемого аналита. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

б) сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора JOE ниже порогового значения. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля экстракции. Рекомендуются повторное ПЦР-исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-):

а) сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора FAM выше порогового значения положительного результата. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.

б) сигнал флуоресценции по каналу для флуорофора JOE выше порогового значения. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.

ФОРМАТ FRT

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-100F

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации участка ДНК *Mycoplasma genitalium* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL <i>Mycoplasma genitalium</i> раскапана под воск	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,01	110 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL-red	Прозрачная жидкость от бесцветного до красного цвета	1,1	1 пробирка
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации участка ДНК *Mycoplasma genitalium* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FL <i>Mycoplasma genitalium</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	1,2	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПКО комплексный	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Программное обеспечение AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft версии 1 и руководство оператора – на электронном носителе или на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

А. Подготовка пробирок для проведения амплификации

А1. Подготовка проб для амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FL *Mycoplasma genitalium* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 4). Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.
2. На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-смеси-2-FL-red, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FL *Mycoplasma genitalium*.
3. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

4. Поставить контрольные реакции:
 - а) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ДНК-буфера.
 - б) положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ПКО комплексного.
 - в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО.

A2. Подготовка проб для амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-1-FL *Mycoplasma genitalium*, 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT и 0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на несколько реакций.

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

2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL *Mycoplasma genitalium*, ПЦР-смесью-2-FRT, полимеразой (TaqF)** и осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-FL *Mycoplasma genitalium*, ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ДНК-буфера.**
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл ПКО комплексного.**

- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе;
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.
2. Запустить программу амплификации:
 - а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft, согласно руководству оператора;

Примечание - Детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS).

- б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной в табл. 13, согласно инструкции по его применению.

Таблица 13

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1»

Цикл	Приборы роторного типа ¹⁰			Приборы планшетного типа ¹¹		
	Температура, °C	Время	Количество циклов	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5	95	5 с	5
	60	20 с		60	20 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	5 с	40	95	5 с	40
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

¹⁰ например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH).

¹¹ например, CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.), ДТ-96/«ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE. При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

3. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации, по двум каналам:

Таблица 14

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Продукт амплификации	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК ВКО-FL

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят вручную с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», или в автоматическом режиме с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft. Порядок работы с ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft описан в руководстве оператора.

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (*Ct*). При использовании ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft значения *Ct* определяются автоматически.

Результаты для контролей этапов экстракции и амплификации должны соответствовать критериям, указанным в табл. 15 и во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Таблица 15

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		FAM	JOE
OK	Экстракция ДНК	отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

При наличии отклонений результатов для контролей от указанных выше интерпретация ряда исследуемых образцов невозможна (см. «Возможные ошибки»).

Принцип интерпретации результатов указан в таблице 16:

Таблица 16

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение Ct по каналу для флуорофора		Результат
FAM	JOE	
отсутствует	определено не более граничного	ДНК <i>M. genitalium</i> НЕ обнаружена
<u>определено</u>	определено или отсутствует	ДНК <i>M. genitalium</i> обнаружена
отсутствует	отсутствует или больше граничного	Невалидный*

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

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE отсутствует или превышает граничное значение. Невозможна интерпретация результатов для всех образцов. Необходимо повторить ПЦР-исследование, начиная с этапа амплификации.
2. Для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK):
 - а) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация

лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК исследуемого анализа. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

б) по каналу для флуорофора JOE значение порогового цикла (C_t) отсутствует или определено больше граничного. Это означает, что ОК не выполнил функцию контроля экстракции. Рекомендуется повторное ПЦР-исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-):

а) по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых обнаружена ДНК исследуемого анализа. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа амплификации.

б) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Невозможна интерпретация результатов для образцов, в которых не обнаружена ДНК исследуемого анализа. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование таких образцов, начиная с этапа амплификации.

4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции (в режиме

просмотра необработанных «сырых» данных) отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). При анализе результатов вручную необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии или при анализе результатов в автоматическом режиме, то требуется повторить амплификацию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

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

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 10 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств.

Хранение.

Формат FEP Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,5 мл) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Mycoplasma genitalium* хранить в защищенном от света месте.

Формат FEP Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FEP (пробирки 0,2 мл) хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Mycoplasma genitalium* хранить в защищенном от света месте.

Формат FRT Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Mycoplasma genitalium* хранить в защищенном от света месте.

Формат FRT Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Mycoplasma genitalium* хранить в защищенном от света месте. Допускается хранение «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F без разукomплектации при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев от даты изготовления до вскрытия. После вскрытия «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F разукomплектовать в соответствии с температурами хранения каждого компонента.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно



Код партии



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 42
сорок два лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицына
«28» марта 2024 г.
М.П.

А.О.Лисицына

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 42 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека



В.Г. Акимкин

« 01 » сентября 2023.

РУКОВОДСТВО ОПЕРАТОРА

по применению программного обеспечения

AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
ПРИНЦИП РАБОТЫ.....	4
УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ	5
Требования к техническим средствам оператора	5
Требования к входным данным	5
Требования информационной безопасности	5
ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ.....	5
Загрузка ПО AmpliSens® <i>Mycoplasma genitalium</i> Soft в ПО ARTS.....	5
Формирование и запуск постановки	6
Анализ и интерпретация результатов	7
Авторизация результатов ПЦР-исследования.....	9
Формирование бланка с результатами	10
СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ	10
ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА И ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ.....	11

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем руководстве применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномный эквивалент (геном)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
Детектирующий амплификатор	- прибор для проведения амплификации с детекцией в режиме «реального времени»
ПК	- персональный компьютер
ПО	- программное обеспечение, программа
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
K-	- отрицательный контроль амплификации
K+	- положительный контроль амплификации
<i>M. genitalium</i>	- <i>Mycoplasma genitalium</i>

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Наименование ПО: AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft.

Версия ПО: 1 (номера минорных и незначимых изменений не указаны).

Варианты исполнения:

AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft Form 1;

AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft Form 2.

Способ размещения и доступа ПО: входит в состав набора реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL». ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft и руководство оператора предоставляются на электронном носителе или на официальном сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

Класс безопасности: Класс А в соответствии с п. 4.3 ГОСТ IEC 62304.

Порядок нумерации версий ПО: Обозначение версии состоит из трех чисел, разделенных точками, означающих нумерацию мажорных, минорных и незначимых изменений соответственно. Мажорные изменения означают изменение функционального назначения, принципа работы, структуры и функций составных частей ПО; минорные изменения означают изменение названий и обозначений в информационном блоке ПО; незначимые изменения означают изменения (включая исправление ошибок) и доработки, не изменяющие функции, описанные для мажорных и минорных изменений.

Примечание – При обозначении версии ПО в составе набора реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL» номера минорных и незначимых изменений не указываются. Полная версия ПО, включая номера минорных и незначимых изменений, указана во вкладыше к набору реагентов и в интерфейсе ПО.

ПО соответствует требованиям ГОСТ IEC 62304.

НАЗНАЧЕНИЕ

Программное обеспечение AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft предназначено для автоматического программирования детектирующего амплификатора и автоматической обработки и интерпретации результатов ПЦР-исследования при использовании набора реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL» (далее – набор реагентов). ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft представляет собой программу, содержащую критерии анализа кривых флуоресценции и алгоритм интерпретации результатов, а также информацию об аналитах, используемом биологическом материале, реагентах и контрольных образцах, программе амплификации, указанных в инструкции к набору реагентов.

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Для работы ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft необходимо ПО AmpliSens® RealTime Soft (далее – ПО ARTS).

В соответствии с информацией об используемом биологическом материале, реагентах, контрольных образцах и программе амплификации, указанной в ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft, ПО ARTS осуществляет запуск детектирующих амплификаторов, используемых для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». После завершения амплификации ПО ARTS визуализирует полученные флуоресцентные кривые и осуществляет автоматический экспорт полученных данных для контрольных и исследуемых образцов в ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft.

ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft проводит автоматическую интерпретацию результатов с использованием полученных значений пороговых циклов (*C_t*), включая оценку валидности контрольных образцов и ПЦР-исследования в целом. Полученные в ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft результаты автоматически передаются в ПО ARTS для их визуализации оператору.

Допускается программирование и запуск детектирующего амплификатора без использования ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft и ПО ARTS. В этом случае файл с данными, полученный на детектирующем амплификаторе, можно экспортировать в ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft для дальнейшей автоматической интерпретации результатов.

Технологии искусственного интеллекта в ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft не используются.

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ

Требования к техническим средствам оператора

Персональный компьютер с предустановленным ПО ARTS. Системные требования к ПК указаны в руководстве оператора ПО ARTS.

Для установки ПО ARTS необходимо обратиться в техническую поддержку для загрузки и запуска установочных файлов ПО ARTS.

Требования к входным данным

Обозначения ячеек исследуемых и контрольных образцов в интерфейсе ПО ARTS должны строго соответствовать их фактическому расположению в реакционном блоке детектирующего амплификатора.

Требования информационной безопасности

Влияние угроз и уязвимостей ПО на пользователей или пациентов отсутствует.

ПО не содержит и не обрабатывает персональные данные пациентов

Доступ к ПО осуществляется с помощью авторизации пользователя в ПО ARTS (учетная запись). Уровень доступа пользователей должен быть обеспечен исходя из требуемой функциональности.

В рамках инфраструктуры информационных технологий, использующей ПО, необходимо:

- предпринять меры обеспечения информационной безопасности и кибербезопасности для непрерывного функционирования программного обеспечения и исключения возможности несанкционированного доступа к информации в программном обеспечении;
- обеспечить наличие регулярных архивных копий ПО с возможностью их восстановления;
- использовать средства защиты от вредоносных программ;
- соблюдать требования к информационной безопасности, указанные в руководстве оператора ПО ARTS.

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ

Загрузка ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft в ПО ARTS

Загрузка ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft в ПО ARTS при наличии подключения ПК к сети Интернет производится автоматически при запуске ПО ARTS.

При отсутствии подключения ПК к сети Интернет загрузка в ПО ARTS производится вручную с электронного носителя путем выбора файла с пакетом ПО, включающим

ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft. Для этого в меню **Постановки** выбрать **Пакеты ПО – Загрузить пакет**.

После завершения загрузки установленное ПО отображается в списке **Пакеты ПО** и доступно для формирования и расчета постановок.

Версия ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft отображается в меню **Каталог методик** в столбце **Версия**, а также в меню **Постановки - Пакеты ПО**, после выбора пакета (версия ПО отображается с указанием номеров минорных и незначимых изменений).

Формирование и запуск постановки

Формирование постановки производится с использованием интерфейса ПО ARTS. В соответствии с руководством оператора к ПО ARTS необходимо выполнить следующие действия:

1. Открыть ПО ARTS.
2. Зарегистрировать серию набора реагентов и ввести переменную информацию (при наличии), используя информацию из вкладыша к данной серии набора реагентов.
3. При необходимости сформировать список образцов для исследования с применением набора реагентов (вручную или загрузить из лабораторных информационных систем).
4. Выбрать детектирующий амплификатор и необходимый реакционный блок.
5. Сформировать постановку. Для этого во вкладке, соответствующей выбранному прибору, выбрать **Постановка - Новая постановка**:
 - 5.1. Выбрать из списка доступных программных обеспечений вариант исполнения AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft Form 1 или AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft Form 2 и серию набора реагентов. AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft Form 1 используется для работы с формой 1 (вариант FRT), AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft Form 2 используется для работы с формой 2 (вариант FRT-100 F) набора реагентов.
 - 5.2. На схематическом изображении реакционного блока детектирующего амплификатора в используемых ячейках разместить образцы из списка, сформированного в п.3 (или ввести их обозначения вручную), и контрольные образцы.
 - 5.3. Сохранить постановку нажатием кнопки **Сохранить**.

6. Для автоматического запуска амплификации нажать кнопку **Старт**. Ход амплификации отобразится в виде кривых накопления флуоресценции.

Примечание – Допускается программирование и запуск детектирующего амплификатора вручную в соответствии с программой амплификации, указанной в инструкции к набору реагентов.

Анализ и интерпретация результатов

После завершения амплификации ПО ARTS автоматически визуализирует кривые флуоресценции.

Примечание – Если детектирующий амплификатор был запрограммирован и запущен вручную, необходимо сформировать постановку, как описано в разделе «Формирование и запуск постановки», нажать кнопку **Выбрать файл** для указания пути к файлу с детектирующего амплификатора и нажать **Рассчитать**.

Соответствие названий флуорофоров и каналов детекции в ПО ARTS указано в таблице 1.

Таблица 1

Флуорофор	FAM	JOE
Название канала детекции в ПО ARTS	FAM	HEX

В соответствии с критериями анализа кривых флуоресценции, указанными в ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft, автоматически определяется статус каждой кривой по каждому каналу детекции: положительный, отрицательный или сомнительный.

Статус присваивается на основании критериев, оценивающих отклонения формы кривой накопления флуоресценции от нормальной (S-образной) формы кривой накопления флуоресценции, например:

- наличие неспецифических скачков флуоресцентного сигнала;
- низкое соотношение сигнал/шум;
- кинетика накопления флуоресцентного сигнала, отличная от S-образной.

Сомнительные кривые классифицируются на «Сомнительно +» и «Сомнительно -», что следует интерпретировать как:

«Сомнительно +» – наиболее вероятно, что для кривой получен положительный результат, требуется подтверждение.

«Сомнительно -» – наиболее вероятно, что для кривой получен отрицательный результат, требуется подтверждение.

Каждой сомнительной кривой необходимо присвоить статус: «Положительный», «Отрицательный» или сделать заключение о необходимости повторного

исследования данного образца. Для этого:

1. Отобразить кривые по всем каналам детекции в режиме отображения «сырых» данных с прибора (режим «RAW»).

ВНИМАНИЕ! Не следует принимать решение о статусе сомнительной кривой на основании просмотра нормализованных кривых (режим «Norma»), т.к. в данном режиме отображаются флуоресцентные кривые после математической обработки.

2. Отфильтровать кривые со статусом «Сомнительный» по каждому каналу. В скобках рядом с названием канала указано количество сомнительных кривых.
3. В списке образцов последовательно присвоить кривым статус «Положительный», «Отрицательный» или сделать заключение о необходимости повторного исследования данного образца («Перестановка» – образцы будут возвращены в список образцов для возможности повторного исследования).

ВНИМАНИЕ! Присвоение статуса сомнительным кривым производится на основании экспертного мнения сотрудника лаборатории, осуществляющего анализ результатов. В случае если для сомнительной флуоресцентной кривой не удастся принять однозначного решения по ее статусу, рекомендуется провести повторное исследование для данного образца.

После просмотра кривых флуоресценции и присвоения статуса всем сомнительным флуоресцентным кривым необходимо нажать кнопку *Результат* для интерпретации результатов.

Во вкладке *AmpliSens Mycoplasma genitalium Soft* будут выведены результаты, автоматически полученные ПО *AmpliSens® Mycoplasma genitalium Soft* на основании значений порогового цикла (Ct) для исследуемых образцов, включая оценку валидности контрольных образцов и ПЦР-исследования в целом.

Результаты для контрольных образцов выводятся в виде таблицы с детализацией по каналам детекции. Если для одного или нескольких контрольных образцов получено сообщение об ошибке, данный результат дублируется в строке статуса постановки.

Результаты для исследуемых образцов выводятся в качественном формате в виде таблицы с учетом статуса контролей и указанием канала детекции.

Возможные варианты интерпретации результатов исследуемых образцов указаны в таблице 2.

Таблица 2

Качественное определение
Обнаружено
Не обнаружено
Невалидный (ВКО)

Возможные варианты результатов для контролей и интерпретации результатов для исследуемых образцов с учетом статуса контролей указаны в таблице 3.

Таблица 3

Статус контроля	Интерпретация результатов для исследуемых образцов с учетом статуса контроля
	В соответствии с таблицами 1 и 2
Контаминация ОКО	Интерпретация невозможна для образцов, в которых обнаружен определяемый аналит
Ошибка ОКО	В соответствии с таблицами 1 и 2
Ошибка К+	Интерпретация невозможна для всех образцов
Ошибка К+ (по каналу ВКО)	Интерпретация невозможна для всех образцов
Контаминация К-	Интерпретация невозможна для образцов, в которых обнаружен определяемый аналит
Контаминация К- (по каналу ВКО)	Интерпретация невозможна для образцов, в которых не обнаружен определяемый аналит

В случаях, перечисленных в таблице 3, для соответствующих исследуемых образцов в таблице результатов выводится сообщение «Интерпретация невозможна» с указанием причины (например, «Интерпретация невозможна (Ошибка К+)»).

Авторизация результатов ПЦР-исследования

После вывода результатов для исследуемых образцов во вкладке **AmpliSens Mycoplasma genitalium Soft** необходимо авторизовать (подтвердить) или отвергнуть (отклонить) результаты автоматической интерпретации. Возможны следующие действия в соответствии с руководством оператора к ПО ARTS:

1. Отправка образца на повторное ПЦР-исследование.
2. Отмена результата ПЦР-исследования всех образцов в постановке.
3. Авторизация результата ПЦР-исследования каждого образца.
4. Авторизация результата ПЦР-исследования всех образцов в постановке.
5. Выгрузка результатов ПЦР-исследования в виде файла в формате CSV (в формате электронной таблицы).
6. Выгрузка постановки в отдельный файл для просмотра в ПО ARTS.
7. Закрытие вкладки с результатами ПЦР-исследования. Вкладка **AmpliSens Mycoplasma genitalium Soft** будет закрыта, результаты ПЦР-исследования будут сохранены. Для возвращения к результатам ПЦР-исследования

необходимо во вкладке **Список постановок** выбрать из списка необходимую постановку и открыть ее двойным щелчком левой кнопки мыши.

Формирование бланка с результатами

ВНИМАНИЕ! Только авторизованные результаты ПЦР-исследования, полученные с помощью ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft, передаются в ПО ARTS для формирования бланков с результатами для исследуемых образцов и/или передачи в лабораторную информационную систему.

Формирование бланков с результатами производится оператором в ПО ARTS. Поиск, просмотр и печать бланков осуществляется через интерфейс ПО ARTS в соответствии с руководством оператора ПО ARTS.

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
Для AmpliSens® <i>Mycoplasma genitalium</i> Soft не размещен контроль К+	В реакционном блоке не размещен К+	Указать положение ПК в реакционном блоке, используя кнопку К+
Для AmpliSens® <i>Mycoplasma genitalium</i> Soft не размещен контроль ОК	В реакционном блоке не размещен ОК	Указать положение ОК в реакционном блоке, используя кнопку ОК
Для AmpliSens® <i>Mycoplasma genitalium</i> Soft не размещен контроль К–	В реакционном блоке не размещен К–	Указать положение К– в реакционном блоке, используя кнопку К–
Ошибка К+	Значение <i>Ct</i> для образца К+ отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора FAM	Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации
Ошибка К+ (по каналу ВКО)	Значение <i>Ct</i> для К+ отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофоров JOE	Необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации
Контаминация ОК	Определено значение <i>Ct</i> для образца ОК по каналу для флуорофора FAM	Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
Контаминация К–	Определено значение C_t для образца К- по каналу для флуорофора FAM	Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех положительных образцов, начиная с этапа амплификации
Контаминация К- (по каналу ВКО)	Определено значение C_t для К- по каналу для флуорофора JOE	Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или кросс-контаминация от пробы к пробе реагентов / исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех отрицательных образцов, начиная с этапа амплификации
Ошибка ОКО	Значение C_t для образца ОК отсутствует или превышает граничное по каналу для флуорофора JOE	Рекомендуется повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА И ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ

При выявлении сбоев в работе ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft рекомендуется обращаться в техническую поддержку. При обращении в техническую поддержку необходимо предоставить следующую информацию:

- Номер версии ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft и ПО ARTS.
- Описание ошибки (текст или изображение).
- Описание действия / последовательности действий, при которых возникла ошибка.
- Контакты для обратной связи.

Сотрудники технической поддержки могут запросить дополнительную информацию для решения вопроса.

Телефон: +7 (495) 304 22 06 в рабочие часы организации.

Почта: lab@amplisens.ru в режиме 24x7.

Разработчик ПО: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по

надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Руководство оператора и интерфейс программного обеспечения разработаны на русском языке и могут быть переведены на другие языки без внесения изменений в программный код ПО.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 12
увеличить лист 06

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)





А.О.Лисицына

«29» марта 2024 г.

М.П.





Инструкция по применению набора реагентов
расположена на сайте www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL»

Формат FEP

Форма 1: **REF** B4-100-R0,5-FEP

REF H-0421-2-5

Форма 2: **REF** B4-100-R0,2-FEP

REF H-0422-2-2



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642,
e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

- «ДНК-сорб-АМ»;
- «ЭДЭМ».

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль (ОКО) экстракции.

ВНИМАНИЕ! ВКО-FL содержится в реагенте ВКО-Дилуент и не требует дополнительного внесения в исследуемые образцы и контроли при использовании комплекта реагентов «ЭДЭМ».

ВНИМАНИЕ! Для образцов мочи требуется предварительная подготовка.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «ДНК-сорб-АМ» добавить:		
ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры), прямой кишки, ротоглотки; моча; секрет предстательной железы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция		
Все образцы	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции с помощью «ЭДЭМ» добавить:		
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры), ротоглотки; моча	100 мкл транспортной среды ТС-ЭДЭМ, содержащей исследуемый образец	в пробирки с ВКО-Дилуентом
Транспортная среда ТС-ЭДЭМ	100 мкл	в пробирку для ОК

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Общий объем реакционной смеси: 30 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 образец «Фон», 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL *Mycoplasma genitalium*** для образца «Фон»; а также для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.

Внести по 20 мкл (если экстракция проб ДНК проведена «ДНК-сорб-АМ»)

ПЦР-смеси-Фон-red	в пробирку «Фон» на поверхность воска	сверху добавить 1 каплю минерального масла для ПЦР при использовании амплификатора без термостатируемой крышки
-------------------	---------------------------------------	--

Внести по 10 мкл (если экстракция проб ДНК проведена «ЭДЭМ»)

ПЦР-буфер-Фон из комплекта «ЭДЭМ»	в пробирку «Фон» на поверхность воска	сверху добавить 1 каплю минерального масла для ПЦР при использовании амплификатора без термостатируемой крышки
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК комплектом «ЭДЭМ»		

ВНИМАНИЕ! После проведения амплификации образцы «Фон» можно хранить в течение 1 мес при температуре от 2 до 20 °С в защищенном от света месте и использовать многократно при условии проведения амплификации с набором реагентов той же серии, того же типа ПЦР-пробирок и экстракции проб ДНК тем же комплектом для экстракции.

Внести по 10 мкл

ПЦР-смеси-2-FL-red	в каждую пробирку для исследуемых и контрольных образцов на поверхность воска, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FL <i>Mycoplasma genitalium</i>	
	сверху добавить по 1 капле минерального масла для ПЦР при использовании амплификатора без термостатируемой крышки	

Внести по 10 мкл

Проб ДНК, экстрагированной из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК	Избегать попадания сорбента в реакционную смесь!
Пробы ДНК, экстрагированной из ОК		
ПКО комплексный	в пробирку для К+	
ДНК-буфер	в пробирку для К-	

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

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

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа рекомендуется дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

Программа амплификации «АмплиСенс-1-FEP»									
Цикл	«Терцик»			GeneAmp PCR System 2700			MaxyGene Gradient		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
0	95	Пауза		95	Пауза		95	Пауза	
1	95	5 мин	1	95	5 мин	1	95	5 мин	1
2	95	2 с	35	95	20 с	20	95	2 с	24
	65	5 с		65	25 с		65	10 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
3	95	2 с	9	95	20 с	24	95	2 с	20
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
	72	5 с		72	30 с		72	10 с	
4	95	2 с	1	95	20 с	1	95	2 с	1
	60	10 с		60	30 с		60	15 с	
5	10	Хранение		10	Хранение		10	Хранение	

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i>	ДНК ВКО-FL

Интерпретация производится автоматически, с помощью программного обеспечения используемого прибора.

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

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2

ддд лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицына

«01» апреля 2024 г.
М.П.



Инструкция по применению набора реагентов
расположена на сайте www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL»

Формат FRT

Форма 1: **REF** R-B4

REF H-0421-1-2

Форма 2: **REF** R-B4-F(RG,iQ)

REF H-0422-1

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642,
e-mail: amplisens@pcr.ru



IVD

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

- «ДНК-сорб-АМ»;
- «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО» (с использованием магнитных штативов вручную или автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот¹);
- «ЭДЭМ».

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО-FL) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

ВНИМАНИЕ! ВКО-FL содержится в реагенте ВКО-Дилуент и не требует дополнительного внесения в исследуемые образцы и контроли при использовании комплекта реагентов «ЭДЭМ».

ВНИМАНИЕ! Для образцов мочи требуется предварительная подготовка.

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «ДНК-сорб-АМ» добавить:

ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры), прямой кишки, ротоглотки; моча; секрет предстательной железы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК

Элюция

Все образцы	100 мкл	в каждую пробирку
-------------	---------	-------------------

При экстракции с помощью «АмплиСенс® МАГНО-сорб-УРО» добавить:

ВКО-FL	10 мкл	в каждую пробирку
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры), прямой кишки, ротоглотки; моча; секрет предстательной железы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция		
Все образцы	100 мкл	в каждую пробирку
При экстракции с помощью «ЭДЭМ» добавить:		
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб со слизистой оболочки цервикального канала и отделяемое слизистой оболочки уретры), ротоглотки; моча	100 мкл транспортной среды ТС-ЭДЭМ, содержащей исследуемый образец	пробирки с ВКО-Дилуэнт
Транспортная среда ТС-ЭДЭМ	100 мкл	в пробирку для ОК

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT

Общий объем реакционной смеси: 30 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FL *Mycoplasma genitalium* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок. Если это не так, не использовать данные пробирки.

Внести по 10 мкл		
ПЦР-смеси-2-FL-red	в каждую пробирку, на поверхность воска, при этом он не должен проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FL <i>Mycoplasma genitalium</i>	
Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК	Избегать попадания сорбента в реакционную смесь!
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО		
ПКО комплексного	в пробирку для К+	
ДНК-буфера	в пробирку для К-	

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-100 F

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: для каждой группы амплифицируемых образцов: 1 положительный (К+) и 1 отрицательный (К-) контроли ПЦР; 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-1-FL <i>Mycoplasma genitalium</i>	$10 \cdot (N+K+1)$	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-смесь-2-FRT	$5 \cdot (N+K+1)$	
Полимераза (TaqF)	$0,5 \cdot (N+K+1)$	

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

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации исследуемых и контрольных образцов:

Внести по 15 мкл		
Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку	
Внести по 10 мкл		
Проб ДНК, экстрагированной из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК	Избегать попадания сорбента в реакционную смесь!
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО		
ПКО комплексного	в пробирку для К+	
ДНК-буфера	в пробирку для К-	

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля и запустить прибор. Рекомендуется:
 - а) перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе;
 - б) в случае неполной загрузки приборов планшетного типа дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора
- Запустить программу амплификации:
 - а) либо с использованием ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft, детектирующий амплификатор должен быть совместим с ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS).
 - б) либо в ручном режиме, запрограммировав детектирующий амплификатор для выполнения программы, указанной ниже, настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

	Программа амплификации «АмплиСенс-1»							
	для приборов роторного типа ²				для приборов планшетного типа ³			
	Темпера-тура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов	Темпера-тура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Кол-во циклов
1	95	15 мин	—	1	95	15 мин	—	1
2	95	5 с	—	5	95	5 с	—	5
	60	20 с	—		60	20 с	—	
	72	15 с	—		72	15 с	—	
3	95	5 с	—	40	95	5 с	—	40
	60	20 с	FAM, JOE		60	30 с	FAM, JOE	
	72	15 с	—		72	15 с	—	

При одновременном проведении других тестов назначается детекция и по другим используемым каналам. Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводить вручную с помощью алгоритма, приведенного в инструкции, или с помощью ПО AmpliSens® RealTime Soft (ПО ARTS) совместно с ПО AmpliSens® *Mycoplasma genitalium* Soft.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Флуорофор	FAM	JOE
Мишень для амплификации	ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i>	ДНК ВКО-FL

ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны настройки для приборов, и граничные значения порогового цикла (*Ct*), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

² например, Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q.

³ например, CFX96, ДТ-96/«ДТпрайм».

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 2

два лист а

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицына

« д » апреля 20 24 г.

М.П.

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека



В.Г. Акимкин

« 07 » ноября 20 23 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

стандартного образца предприятия № 24 «Положительный
контрольный образец, содержащий ДНК *Mycoplasma*
genitalium»

(СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium*)



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

1 ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

1.1 Инструкция устанавливает порядок и условия применения стандартного образца предприятия № 24 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК *Mycoplasma genitalium*» (СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium*), далее по тексту СОП, предназначенного для проведения испытаний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией набора реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL».

1.2. Проверку упаковки, маркировки и целостности СОП проводят путем внешнего осмотра.

2 МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ. УДАЛЕНИЕ ОТХОДОВ

При работе с СОП и при постановке ПЦР следует соблюдать положения МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку следует удалять 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».

3 МАТЕРИАЛЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

3.1 Материалы и оборудование, необходимые для проведения ПЦР-анализа, согласно ТУ и/или инструкции к испытываемому набору реагентов.

3.2 Реагенты из испытываемого набора реагентов.

3.3 Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.

4 ПОДГОТОВКА К ПРИМЕНЕНИЮ

Перед началом работы достать из холодильника пробирку с СОП и дать нагреться до комнатной температуры. СОП должен представлять собой прозрачную жидкость, не содержащую каких-либо включений или примесей. Оценить визуально.

5 ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

5.1 Содержимое пробирки с СОП перемешать и осадить капли на вортексе. Открыть пробирку и, используя наконечник с аэрозольным барьером, отобрать необходимый объем (см. следующий пункт), пробирку закрыть.

5.2 Приготовить разведения, указанные в ТУ / методике испытаний набора реагентов, с использованием ТЕ-буфера, приложенного к СОП.

Примечание – Для пересчета из копии/мл в ГЭ/мл необходимо использовать коэффициент из инструкции по применению испытываемого набора реагентов.

Разведения готовить по следующей схеме:

- 1) исходный препарат, имеющий концентрацию $N \times 10^m$, развести N-кратно до ближайшего разведения 10^m с коэффициентом 1 (1×10^m).

Разведение провести согласно расчету, с использованием следующих формул:

$$N \times 10^m / 1 \times 10^m = N \quad (1)$$

$$C/N=A \quad (2)$$

$$C-A=B \quad (3), \text{ где}$$

$N \times 10^m$ – исходная концентрация СОП,

1×10^m – ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 ГЭ/мл.

N – во сколько раз необходимо развести исходный препарат, для того чтобы получить ближайшее к исходной концентрации разведение с коэффициентом 1 (при необходимости полученное число округлить до целого),

A – объем исходного СОП, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл),

B – объем ТЕ-буфера, который необходимо взять для приготовления C мкл раствора, содержащего СОП в концентрации 1×10^m , ближайшего к исходной концентрации разведения с коэффициентом 1 (мкл);

C – объем раствора, содержащий СОП в концентрации 1×10^m .

- 2) Полученный препарат СОП с концентрацией 1×10^m ГЭ/мл развести последовательно десятикратно до получения первого разведения СОП с концентрацией, указанной в ТУ / методике испытаний набора реагентов;
- 3) Из полученного первого разведения СОП с коэффициентом 1, приготовить последующие разведения, указанные в ТУ/методике испытаний, путем последовательных двукратных, пятикратных и/или десятикратных разведений.

Например, СОП имеет концентрацию 1×10^6 ГЭ/мл, согласно необходимо подготовить разведения с концентрациями 1×10^5 , 1×10^4 и 1×10^3 :

- промаркировать пробирки вместимостью 1,5 мл « 1×10^5 », « 1×10^4 », « 1×10^3 »;

- рассчитать объем ТЕ-буфера для хранения ДНК, который необходимо внести в пробирку, для получения концентрации препарата, равной 1×10^5 ГЭ/мл:

$$1 \times 10^6 \text{ ГЭ/мл} / 1 \times 10^5 \text{ ГЭ/мл} = 10 \quad (1)$$

$$100 / 10 = 10 \text{ мкл} \quad (2)$$

$$100 \text{ мкл} - 10 \text{ мкл} = 90 \text{ мкл} \quad (3);$$

- в пробирку, маркированную « 1×10^5 », внести автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 90 мкл ТЕ-буфера и 10 мкл исходного СОП. При внесении СОП в буфер пипетировать вносимый реагент не менее 5 раз, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки;

- в пробирку, маркированную «1х10⁴», внести автоматическим дозатором, используя отдельный наконечник с аэрозольным барьером, 90 мкл ТЕ-буфера для хранения ДНК и 10 мкл СОП с концентрацией 1х10⁵ ГЭ/мл. При внесении СОП в буфер пипетировать вносимый реагент не менее 5 раз, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

- разведение 1х10³ приготовить аналогичным способом.

Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию не менее 1х10³ ГЭ/мл, можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес. Приготовленные разведения СОП, имеющие концентрацию менее 1х10³ ГЭ/мл, хранению не подлежат и готовятся заново из разведения СОП с концентрацией 1х10³ ГЭ/мл.

5.3 Далее провести анализ разведений СОП в соответствии с ТУ / методикой испытаний набора реагентов.

6 ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Реагент	Объем, мл	Количество
<u>СОП</u> № 24 ПКО ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i>	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	1,5	1 пробирка

7 СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

В соответствии со свидетельством на СОП. Срок годности и условия хранения вскрытого СОП соответствует сроку годности и условиям хранения невскрытого стандартного образца предприятия.

8 АДРЕСА ДЛЯ СПРАВOK И РЕКЛАМАЦИЙ

Рекламации направлять в адрес производителя: 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, тел. (495) 974-96-42.

СВИДЕТЕЛЬСТВО

на стандартный образец предприятия № 24 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК *Mycoplasma genitalium*» (СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium*)

Реагент	Серия	Срок годности
СОП № 24 ПКО ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i>	03.03.23/07.05.23/310	2033-03-03

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Стандартный образец предприятия № 24 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК *Mycoplasma genitalium*» (СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium*), предназначен для проведения испытаний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации набора реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL».

2 ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ

СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium* представляет собой прозрачный бесцветный раствор бактериофагов λ , содержащих фрагмент ДНК *Mycoplasma genitalium*.

3 АТТЕСТОВАННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Концентрация ДНК *Mycoplasma genitalium* $1,21 \times 10^6$ ГЭ/мл (6,08 lg ГЭ/мл; стандартное отклонение 0,01 lg ГЭ/мл).

Коэффициент пересчета 1 ГЭ/мл = 1 копии/мл для набора реагентов «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL».

4 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение срока годности. Транспортировать при температуре от 2 до 8 °C не более 5 сут.

5 РИСКИ И МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium* не содержит запрещенных к пересылке наземным или авиатранспортом взрывоопасных, наркотических, психотропных, токсичных веществ и инфекционных агентов.

При работе следует соблюдать положения МУ 1.3.2569-09 [1] и меры безопасности, указанные в инструкции по применению данного стандартного образца предприятия.

6 ДОКУМЕНТ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ПОРЯДОК И УСЛОВИЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Инструкция по применению стандартного образца предприятия № 24 «Положительный контрольный образец, содержащий ДНК *Mycoplasma genitalium*» (СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium*).

7 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ И КОНТРОЛЬ ПРОДУКТА

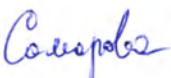
7.1 Для приготовления СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium* используют КР ПКО M.genitalium-FL.

- 7.2 КР ПКО *M.genitalium*-FL был получен путем клонирования фрагмента ДНК *Mycoplasma genitalium*, в модифицированный вектор, в клетках *E.coli*, с последующей индукцией экспрессии частиц бактериофага λ . Специфичность клонированного фрагмента подтверждена методом прямого секвенирования.
- 7.3 Полученный препарат бактериофага λ протестирован с помощью *in house* методики, основанной на методе лимитирующих разведений, предложенном Taswell C., 1981 [2] и Rodrigo A.G et al., 1997 [3], и с помощью набора «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL» РУ № ФСР 2007/00580.
- 7.4 Для приготовления СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium* КР ПКО *M.genitalium*-FL разводят в буфере для хранения ДНК до требуемой концентрации.
- 7.5 Приготовленный СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium* фасуют в соответствии с объемом, указанным в инструкции по применению данного стандартного образца, и хранят в соответствии с настоящим свидетельством.
- 7.6 В соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 15194 [4] проводят аттестацию СОП № 24 ПКО ДНК *Mycoplasma genitalium* данной серии, по схеме, описанной в п. 5.6 ГОСТ ISO 17511-2011 [5]. См. приложение 1.

8 БИБЛИОГРАФИЯ

1. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
2. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. // J. Immunology, 1981, vol. 126, pp. 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). pp. 737-742.
4. ГОСТ Р ИСО 15194 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в пробах биологического происхождения. Требования к аттестованным стандартным образцам и содержанию сопроводительной документации».
5. ГОСТ ISO 17511-2011 «Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам».

Старший технолог УКО
НПЛ ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

 Самарова Е.А.
« 07 » ноября 2023 г.

Отчет об измерении
по п. 5.6 ГОСТ ISO17511-2011

Выбранная производителем методика выполнения измерений	Тестирование с помощью in house методики, основанной на методе лимитирующих разведений
Тестируемый образец (рабочий калибратор производителя)	СОП № 24 ПКО ДНК <i>Mycoplasma genitalium</i>
Серия	03.03.23/07.05.23/310
Дата измерения	07.03.23
Среднее значение концентрации, ГЭ/мл	$1,21 \times 10^6$
Среднее значение концентрации, lg ГЭ/мл	6,08
Стандартное отклонение (SD), lg ГЭ/мл	0,01

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 4
с. 116 лист 08

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 188/23 от 16.11.2023 г.)



А.О.Лисицына
«29» марта 20 24 г.

А.О.Лисицына

М.П.