

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

_____ А.В. Ходяков



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydothila*
pneumoniae, *Streptococcus pneumoniae* И
Haemophilus influenzae В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ
ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ
«РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH PNEUMOVAST (R)) ПО
ТУ 20.59.52-048-19926214-2024

Инструкция по применению версии 16.12.24

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

_____ А.С. Коновалов

16.12.2024

Руководитель научной группы
ООО «Амплитек»

_____ Г.А. Хайруллина

16.12.2024

Руководитель отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

_____ П.Г. Рыжих

16.12.2024

Amplitech PneumoBact (R)

Набор реагентов для качественного определения ДНК
Mycoplasma pneumoniae, *Chlamydophila pneumoniae*,
Streptococcus pneumoniae и *Haemophilus influenzae* в
биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией
в режиме «реального времени» (Amplitech PneumoBact (R)) по
ТУ 20.59.52-048-19926214-2024

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

IVD

Форма 1 **REF** P038-1 Σ 96

Форма 2 **REF** P038-2 Σ 96

СОДЕРЖАНИЕ

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

ВВЕДЕНИЕ

1. Настоящая инструкция по применению версии 16.12.24 распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для качественного определения ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech PneumoBact (R)) по ТУ 20.59.52-048-19926214-2024» (далее – набор).

Краткое наименование набора: Amplitech PneumoBact (R).

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

2. Микроорганизмы *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* вызывают инфекции нижних и верхних дыхательных путей, в том числе тяжелые внебольничные пневмонии. Этиологическая структура пневмоний, особенно у детей, разнообразна и зависит от возраста ребенка. В зависимости от определенного этиологического агента курс лечения может отличаться. Наиболее точным методом дифференциации указанных инфекций является ПЦР в реальном времени, которая обладает высокой чувствительностью, специфичностью и объективностью полученных результатов. Набор реагентов «Amplitech PneumoBact (R)» позволяет выявлять и дифференцировать ДНК указанных микроорганизмов в рамках одной реакции.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

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

- мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки;
- мокрота;
- бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ).

Набор предназначен для лабораторной диагностики *in vitro* (выявление ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*). Применение набора не зависит от популяционных и демографических аспектов.

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Набор предназначен для применения в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с клинической симптоматикой инфекций нижних и верхних дыхательных путей, а также от лиц, не имеющих признаков простудных заболеваний. Отрицательные результаты исследования с помощью набора не исключают возможность инфицирования микроорганизмами, выявляемыми с помощью набора, и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациента. Отрицательные результаты исследования должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Набор может применяться в клинко-диагностических лабораториях.

3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания к применению набора отсутствуют.

4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ

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

5 ФОРМЫ ВЫПУСКА

Набор выпускается в двух формах¹ (см. таблицу 1).

Таблица 1

Описание форм выпуска набора

Форма	Описание	Количество исследований, в том числе для контролей
1	Готовая к применению реакционная ПЦР-смесь в виде геля, распапанная в 96-луночный планшет	96
2	Готовая к применению реакционная ПЦР-смесь для разнесения по пробиркам	96

¹ Набор в форме выпуска 1 упакован в коробку из картона, в форме выпуска 2 - в полиэтиленовый пакет с застёжкой Zip-Lock.

6 СОСТАВ

Состав набора указан в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Состав формы 1

Компонент	Номинальный объем, мл	Кол-во	Внешний вид
Планшет со Смесью PneumoBact (R) (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	—	1 шт.	96-луночный делимый планшет, заклеенный защитной плёнкой, с реагентом в виде геля (от светло-розового до красного цвета) на дне пробирок
Плёнки для планшета	—	2 шт.	Клейкие плёнки
ВК (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с ДНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК R (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами ДНК выявляемых микроорганизмов)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	—	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	—	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	—	1 шт.	В электронном ² виде по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

Таблица 3

Состав формы 2

Компонент	Номинальный объем, мл	Кол-во	Внешний вид
Смесь PneumoBact (RW) (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	0,96	1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло-серого до фиолетового цвета
ВК (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с ДНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК R (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами ДНК выявляемых микроорганизмов)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	—	1 шт.	В электронном ² виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	—	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	—	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

7 ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследование с помощью набора проводится методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Детекция продуктов ПЦР и отдельное выявление мишеней обеспечивается применением в реакционной смеси для ПЦР флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, сигналы от которых регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 4).

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

Каналы детекции мишеней

Канал детекции сигнала от флуорофора	Мишень	Область амплификации
FAM	ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Lipoprotein gene
R6G ³	ДНК <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	ompA gene
ROX	ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Spn9802
Cy5	ДНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность
Cy5.5	ДНК <i>Haemophilus influenzae</i>	Hpd (glpQ) gene

7.1 Характеристика положительного контроля ПК R

Концентрация клонированных фрагментов ДНК всех выявляемых микроорганизмов в ПК R составляет $5 \lg \pm 0,5 \lg$ копий/мл. Концентрация определяется с помощью установленной производителем методики выполнения измерений на основе метода лимитирующих разведений [1, 2].

8 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются оборудование и материалы, указанные в таблице 5.

Таблица 5

Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором

Необходимое оборудование и материалы в случае	
автоматизированной подготовки к проведению ПЦР для формы выпуска 1	ручной подготовки к проведению ПЦР для форм выпуска 1 и 2
- автоматическая станция пробоподготовки «Amplitech E1» («Амплитек», Россия; РУ № РЗН 2022/16981); - программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446)); - холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; - ёмкость для сброса использованных материалов; - перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.	- ПЦР-бокс; - центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518); - дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 5 до 200 мкл (РУ № ФСР 2009/05681); - программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446)); - штатив для ПЦР-планшетов (при использовании формы 1) (РУ № ФСЗ 2011/10287); - штатив для пробирок объёмом 0,2 мл (при использовании формы 2); - холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; - пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз (при использовании формы 2); - наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 20 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз; - ёмкость для сброса использованных материалов; - перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

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

9 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

Работа с набором должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований ГОСТ Р 15190 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов исследования.
- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.
- Утилизировать реагенты и плёнки для планшета (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» к утилизации медицинских отходов класса Г.
- Не открывать пробирки с продуктами амплификации в процессе их сбора и утилизации.
- Утилизировать биологический материал, а также расходные материалы и инструменты, загрязнённые биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 к утилизации медицинских отходов класса Б.
- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию, указанному в таблицах 2 и 3 для соответствующей формы выпуска набора.
- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром.
- Использовать защитную одежду в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Все операции

проводить только в одноразовых неопудренных перчатках для исключения контакта с организмом человека.

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

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

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

10 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Набор предназначен для исследования только биологического материала, указанного в разделе 1. Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение биологического материала следует проводить в соответствии с:

- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»;
- требованиями, перечисленными в таблицах 6 и 7.

Таблица 6

Требования к взятию и предварительной обработке исследуемого материала

Взятие мазков со слизистой оболочки ротоглотки, носоглотки

Взятие мазка провести с помощью сухого медицинского стерильного одноразового зонда (например, ООО «ФармМедПолис РТ», Россия; РУ № РЗН 2021/13989) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия; РУ № ФСР 2009/05011) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).

Взятие и предобработка мокроты

Взятие материала в количестве не менее 1 мл провести в стерильный одноразовый контейнер с широким горлом (диаметром не менее 30 мм) и закрывающейся крышкой.

Предобработка:

Провести разжижение мокроты, используя реагент для предобработки мокроты с целью проведения экстракции нуклеиновых кислот (например, реагент «Муколизин» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или реагент, соответствующий по составу требованиям п. 1.7 Приложения 2 МУ 1.3.2569-09).

Взятие и предобработка бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ)

При проведении бронхоскопии взять не менее 5 мл материала в стерильный одноразовый контейнер с закрывающейся крышкой.

Предобработка:

Взболтать ёмкость и перенести 1 мл образца, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку. Центрифугировать 10 мин при 10000 x g. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник без фильтра для каждого образца, удалить супернатант, оставляя над осадком 100–200 мкл надосадочной жидкости. Тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Требования к условиям транспортирования и хранения исследуемого материала

Условия транспортирования и хранения
Мазки со слизистой оболочки носоглотки, ротоглотки
Согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.
Мокрота (до и после предобработки)
• При температуре от 2 °С до 8 °С не более 2 суток; • При температуре минус 20 °С более 2 суток. Допускается однократное замораживание материала.
Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)
• При температуре от 2 °С до 8 °С не более 3 суток; • При температуре минус 20 °С не более 12 мес. Допускается однократное замораживание

11 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

11.1 Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 и автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции

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

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

11.1.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК R и осадить капли на вортексе.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ВНИМАНИЕ! Запуск протокола необходимо провести в течение 30 минут после установки всех реагентов на рабочем столе станции.

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

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесённым элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

11.1.8 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 8.

Таблица 8

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

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	2 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ⁴ , ROX, Cy5, Cy5.5	

Примечания

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

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

11.2 Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 или 2. Проведение ПЦР и детекции

11.2.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК R и осадить капли на вортексе.

11.2.2 Провести экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Ампитек») формы 1 или формы 2 (с применением автоматической или ручной методики соответственно) согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объёме 100 мкл.

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

11.2.3 В зависимости от используемой формы выпуска набора «Amplitech PneumoBact (R)» провести подготовку к проведению ПЦР в соответствии с таблицей 9.

⁴ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

**Подготовка к проведению ПЦР в зависимости от формы выпуска набора
«Amplitech PneumoBact (R)»**

Подготовка к проведению ПЦР при использовании	
формы 1	формы 2
- Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью PneumoBact (R) - Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку. - Для удобства внесения образцов ДНК рекомендуется установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов. - Внести в подготовленные пробирки по 20 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК R). ВНИМАНИЕ! При внесении ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь. - Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха. - После внесения образцов ДНК заклеить пробирки плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech PneumoBact (R)».	- Перемешать содержимое пробирки со Смесью PneumoBact (RW) и осадить капли на вортексе. - Внести в ПЦР-пробирки по 10 мкл Смеси PneumoBact (RW). - Внести в подготовленные пробирки с реакционной Смесью по 15 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК R). ВНИМАНИЕ! При внесении ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь. - Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха. - После внесения образцов ДНК закрыть пробирки крышкой.

ВНИМАНИЕ! Пробирки после внесения ДНК не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесенным элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

11.2.4 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 10.

Таблица 10

Программа ПЦР и детекции при ручной подготовке к проведению ПЦР

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

Примечания

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

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

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

12 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 12.1 Учёт результатов осуществляется с помощью программного обеспечения используемого амплификатора согласно инструкции по его применению. Рекомендуются выставлять пороговую линию на уровне 10 % от разгорания положительного контроля. Кривые флуоресценции, пересекающие пороговую линию, должны иметь сигмообразную форму.
- 12.2 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 11.

Таблица 11

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат		Интерпретация
1	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁶ . По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значения Ct отсутствуют.	ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomydia pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> и <i>Haemophilus influenzae</i> в образце не выявлены.
2	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу FAM определено значение Ct.	В образце выявлена ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
3	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу R6G определено значение Ct.	В образце выявлена ДНК <i>Chlamydomydia pneumoniae</i> .
4	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу ROX определено значение Ct.	В образце выявлена ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
5	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу Cy5.5 определено значение Ct.	В образце выявлена ДНК <i>Haemophilus influenzae</i> .
6	По двум и более каналам для специфических мишеней (FAM, R6G, ROX, Cy5.5) определено значение Ct.	Интерпретация проводится в соответствии с пп. 2–5. Например: В образце выявлены ДНК <i>Chlamydomydia pneumoniae</i> и <i>Haemophilus influenzae</i> .
7	По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значения Ct отсутствуют.	Невалидный результат

Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей 12.

Таблица 12

Критерии оценки для контролей

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

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

13 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Рекомендации по устранению возможных ошибок, получаемых для исследуемых образцов и контролей в процессе исследования с помощью набора, указаны в таблице 13.

Таблица 13

Рекомендации по устранению ошибок

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для ПК значение Ct по каналу FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5 и/или Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного ⁷ .	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК по каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного.	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК по каналу FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5.5 определено значение Ct.	Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации.	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Невалидный результат для исследуемого образца (значение Ct по каналу Cy5 отсутствует или определено больше граничного, по каналам FAM, R6G, ROX, Cy5.5 значения Ct отсутствуют).	Некорректное проведение экстракции ДНК. Наличие в образце ингибиторов ПЦР.	Повторить исследование данного исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторное взятие и исследование биологического материала.
Для исследуемого образца/контролей определено значение Ct, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъёма (график представляет собой приблизительно прямую линию).	Некорректный выбор уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Некорректное проведение ПЦР.	Проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца или, в случае некорректного вида графика для контроля, амплификацию и детекцию для всех исследуемых образцов и контролей.

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

14 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

14.1 Контроли, используемые в процессе исследования

Результаты исследования контролей должны соответствовать критериям оценки, указанным в разделе 12.

14.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;
- ПК R для контроля корректного прохождения исследования.

14.1.2 Внутренний контроль

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

14.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

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

14.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

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

15 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА⁸

15.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора указан в таблице 14.

Таблица 14

Предел обнаружения		
Мишень	Предел обнаружения, ГЭ/мл	95 %-ый ДИ, ГЭ/мл
ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1000	477-1446
ДНК <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	1000	540-1760
ДНК <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1000	497-1646
ДНК <i>Haemophilus influenzae</i>	1000	162-1472

15.2 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 15, геномной ДНК человека, а также НК выявляемых микроорганизмов. НК микроорганизмов исследовалась в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл, геномная ДНК человека - в концентрации 1 мкг/мл. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 15

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Наименование	Наименование	Наименование
Adenovirus B	Coronavirus HKU1	<i>Legionella pneumophila</i> (ATCC® 33152)
Adenovirus C	Coronavirus NL63	MERS-CoV
Adenovirus E	Coronavirus OC43	Parainfluenza virus типа 1 (Сендай)
Bocavirus	Human Metapneumovirus (HM-1)	Parainfluenza virus 2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Human Rhinovirus A (Рино/1а/Ленинград/78)	Parainfluenza virus 3
<i>Bordetella parapertussis</i>	Influenza virus A (A/Anhui/1/2013(H7N9))	Parainfluenza virus 4
<i>Bordetella pertussis</i>	Influenza virus B (B/Москва/46/2019)	Respiratory syncytial virus (hRSV-1)
Coronavirus 229E	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SARS-CoV-2 (вариант «Омикрон», ГБК1343)

15.2.1 Потенциально интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующие вещества (ингибиторы ПЦР) и их максимальные концентрации в образце, для которых оценивалось их ингибирующее влияние на ПЦР, перечислены в таблице 16.

⁸ Заявленные аналитические характеристики набора, кроме аналитической специфичности, проверены с использованием стандартных образцов предприятия, содержащих векторы со специфическими последовательностями ДНК выявляемых микроорганизмов.

Потенциально интерферирующие вещества

Исследуемый материал	Интерферент	Активный компонент	Тип интерферента	Концентрация вещества в образце	Обоснование исследованной концентрации
Мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки, Мокрота, Бронхоальвеолярный лаваж	Цельная кровь	Гемоглобин, холестерин, триглицериды	Эндогенная субстанция	5 % v/v	Объем в образце в условиях «наихудшего случая»
	Муцин	Очищенный белок		5 % v/v	
	Раствор хлоргексидина	Хлоргексидин	Раствор для наружного применения	0,25 %	

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

15.3 Прецизионность измерения

Коэффициент вариации повторяемости CV_p пороговых циклов (C_t), характеризующий внутрисерийную повторяемость измерений с использованием набора, не превышает 5 %.

Коэффициент вариации воспроизводимости CV_v пороговых циклов (C_t), характеризующий межсерийную воспроизводимость измерений с использованием набора, не превышает 10 %.

15.4 Диагностические характеристики

Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) набора с доверительной вероятностью 95 % указаны в таблице 17.

Таблица 17

Диагностические характеристики

Исследуемый материал	Мишень	Количество образцов		ДЧ, %	ДС, %
		положит.	отрицат.		
Мазки со слизистой оболочки носоглотки	ДНК <i>M. pneumoniae</i>	150	167	98-100	98,2-100
	ДНК <i>C. pneumoniae</i>	122	195	97,6-100	98,5-100
	ДНК <i>S. pneumoniae</i>	129	188	97,7-100	98,4-100
	ДНК <i>H. influenzae</i>	104	213	97,2-100	98,6-100
Мазки со слизистой оболочки ротоглотки	ДНК <i>M. pneumoniae</i>	150	167	98-100	98,2-100
	ДНК <i>C. pneumoniae</i>	122	195	97,6-100	98,5-100
	ДНК <i>S. pneumoniae</i>	129	188	97,7-100	98,4-100
	ДНК <i>H. influenzae</i>	104	213	97,2-100	98,6-100
Мокрота	ДНК <i>M. pneumoniae</i>	141	166	97,9-100	98,2-100
	ДНК <i>C. pneumoniae</i>	118	189	97,5-100	98,4-100
	ДНК <i>S. pneumoniae</i>	132	175	97,8-100	98,3-100
	ДНК <i>H. influenzae</i>	102	205	97,1-100	98,5-100
Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)	ДНК <i>M. pneumoniae</i>	74	74	96-100	96-100
	ДНК <i>C. pneumoniae</i>	74	74	96-100	96-100
	ДНК <i>S. pneumoniae</i>	74	74	96-100	96-100
	ДНК <i>H. influenzae</i>	74	74	96-100	96-100

16 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

16.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты ВК, ПК R, ОК, Смесь PneumoBact (RW) использовать до истечения срока годности набора. Планшет со Смесью PneumoBact (R) после снятия защитной пленки хранить не более 30 минут.

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

16.2 Хранение

Форму выпуска 1 в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 до 75 % в защищённом от солнечного света месте. Планшет со Смесью PneumoBact (R) беречь от влаги. После транспортирования допускается хранить набор не более 5 суток при температуре от 8 °С до 25 °С.

Форму выпуска 2 в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 % в защищённом от солнечного света месте.

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

16.3 Транспортирование

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

Допускается транспортировать набор формы выпуска 1 при температуре от 8 °С до 25 °С не более 10 суток.

16.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Повторное применение использованных для исследования реагентов не допускается.

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

17 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

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

18 БИБЛИОГРАФИЯ

1. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies // J. Immunology. – 1981. – Vol. 126. – P. 1614–1619.
2. Allen G. Rodrigo, Paul C. Goracke, Kiarash Rowhanian, James I. Mullins. Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays // AIDS research and human retroviruses. – 1997. – Vol. 13 (9). – P. 737–742.

19 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

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

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний

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

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

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

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

20 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

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

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

21 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

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

22 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Изготовитель



Дата изготовления



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Обратитесь к инструкции по применению



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Номер по каталогу



Код серии



Использовать до



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Не допускать воздействия влаги



Диапазон влажности



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

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито

21 (двадцать одна)
лист (а/бв)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплитек»

А.В. Ходяков



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 21 ЛИСТОВ

12 202 4 год

Ген. Директор
ООО «~~ВЫМЕД~~ МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



КОПИЯ
ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Амплитек»

А.В. Ходяков



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*,
Streptococcus pneumoniae и
Haemophilus influenzae в биологическом материале
человека методом ПЦР с детекцией в режиме
«РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH PNEUMOVAST (R)) ПО
ТУ 20.59.52-048-19926214-2024

Краткое руководство для формы выпуска 1

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

А.С. Коновалов

23.10.2024

Руководитель отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

П.Г. Рыжих

23.10.2024

Amplitech PneumoBact (R)

Набор реагентов для качественного определения ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech PneumoBact (R)) по ТУ 20.59.52-048-19926214-2024

КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО

IVD

REF

P038-1

LOT

xxxx

Σ 96

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

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

Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы ДНК, экстрагированной из следующих видов биологического материала:

- мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки;
- мокрота;
- бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ).

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

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

- 1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК R и осадить капли на вортексе.
- 2 Провести экстракцию ДНК с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек») формы 1 (с применением автоматической методики) согласно инструкции по его применению.

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

- 3 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесью РнеумоВакт (R) и снять с них защитную плёнку.
- 4 Установить отрезанные пробирки со Смесью РнеумоВакт (R) на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.
- 5 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:

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

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

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



ВНИМАНИЕ! Запуск протокола необходимо провести в течение 30 минут после установки всех реагентов на рабочем столе станции.

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

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесенным элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

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

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

Примечания

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

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

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

При необходимости ручной подготовки к ПЦР после экстракции ДНК с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Ампитек») (с применением автоматической или ручной методики), необходимо:

- 1 Установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов.
- 2 Внести в подготовленные пробирки по **20 мкл** образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК R).

Программа амплификации для этого случая описана ниже:

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

Учёт и интерпретация результатов

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

Наличие Ct	FAM	R6G ¹	ROX	Cy5.5
Выявлена ДНК	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>

Примечание – В случае отсутствия ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в исследуемом образце необходимо проверить наличие Ct по каналу **Cy5** со значением **Ct ≤ 33**. В противном случае результат считать **невалидным**.

- 2 Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей², приведённой ниже:

Образец	Граничное значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G ¹	ROX	Cy5	Cy5.5
ОК	—	—	—	≤ 33	—
ПК R	≤ 34	≤ 34	≤ 34	≤ 33	≤ 34

¹ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

² Переменная информация, специфичная для лота, выделена цветом.

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито

4 (четыре)

лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплитек»

«АМПЛИТЕК»

А.В. Ходяков



КОПИЯ
ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

А.В. Ходяков



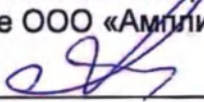
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* И
Haemophilus influenzae В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ
ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ
«РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH PNEUMOVAST (R)) ПО
ТУ 20.59.52-048-19926214-2024

Краткое руководство для формы выпуска 2

Лист утверждения

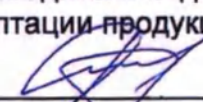
СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

 А.С. Коновалов

23.10.2024

Руководитель отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

 П.Г. Рыжих

23.10.2024

Amplitech PneumoBact (R)

Набор реагентов для качественного определения ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech PneumoBact (R)) по ТУ 20.59.52-048-19926214-2024

КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО



P038-2



xxxx



96

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

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

Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы ДНК, экстрагированной из следующих видов биологического материала:

- мазки со слизистой оболочки носоглотки и/или ротоглотки;
- мокрота;
- бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ).

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

- 1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК R и осадить капли на вортексе.
- 2 Провести экстракцию ДНК с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек») формы 1 или формы 2 (с применением автоматической или ручной методики соответственно) согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объеме 100 мкл.

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

- 3 Перемешать содержимое пробирки со Смесью PneumoBact (RW) и осадить капли на вортексе.
- 4 Внести в ПЦР-пробирки по 10 мкл Смеси PneumoBact (RW).
- 5 Внести в подготовленные пробирки с реакционной Смесью по 15 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК R).

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

- 6 Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха.
 - 7 После внесения образцов ДНК закрыть пробирки крышкой.
- ВНИМАНИЕ!** Пробирки после внесения ДНК не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на крышку. Пробирки с реакционной смесью с внесенным элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.
- 8 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной ниже.

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

Примечания

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

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

¹ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Учёт и интерпретация результатов

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

Наличие Ct	FAM	R6G ¹	ROX	Cy5.5
Выявлена ДНК	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>

Примечание – В случае отсутствия ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в исследуемом образце необходимо проверить наличие Ct по каналу **Cy5** со значением Ct ≤ 33. В противном случае результат считать **невалидным**.

- 2 Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей², приведённой ниже:

Образец	Граничное значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G ¹	ROX	Cy5	Cy5.5
ОК	–	–	–	≤ 33	–
ПК R	≤ 34	≤ 34	≤ 34	≤ 33	≤ 34

² Переменная информация, специфичная для лота, выделена цветом.

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито

4 (20 л.р.)

лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплик»

А.В. Ходяков



КОПИЯ
ВЕРНА

ПАСПОРТ № 1184-24

Amplitech PneumoBact (R)

Набор реагентов для качественного определения ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech PneumoBact (R)) по ТУ 20.59.52-048-19926214-2024

REF P038-1

LOT 1184

 2024-11-13

 2025-11-13

Условия транспортирования:

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

Условия хранения:

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

Контроль качества набора проведен по ТУ 20.59.52-048-19926214-2024.

Состав набора и внешний вид компонентов

Лот компонента	Норма			Результат контроля
	наименование	количество	внешний вид	
00001	Планшет со Смесью PneumoBact (R)	1 шт.	96-луночный делимый планшет, заклеенный защитной плёнкой, с реагентом в виде геля (от светло-розового до красного цвета) на дне пробирок	Соответствует
00076	Плёнки для планшета	2 шт.	Клейкие плёнки	Соответствует
00022	ВК	0,96 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
00046	ОК	0,8 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
00004	ПК R	0,8 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
–	Инструкция по применению	1 шт.	В электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/	Соответствует
–	Краткое руководство	1 шт.	В бумажном виде	Соответствует
–	Паспорт	1 шт.	В электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/	Соответствует

Упаковка набора

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

Маркировка набора

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

Функциональные характеристики набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Предел обнаружения		
Выявление ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> и <i>Haemophilus influenzae</i> в концентрации 1000 ГЭ/мл	ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> и <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружены.	Соответствует

Показатель	Норма	Результат контроля
Валидность результатов тестирования для исследуемых образцов	Последовательность ВК обнаружена.	Соответствует
Валидность результатов тестирования для контролей исследования (ОК, ПК)	Результаты соответствуют критериям оценки, указанным в инструкции по применению набора.	Соответствует

Заключение: Набор указанного лота соответствует требованиям ТУ 20.59.52-048-19926214-2024.

Дата выдачи паспорта: 13.11.2024

Руководитель ОКК, Романенкова Е.С.



Пронумеровано, скреплено и прошито

2 (два)
лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью

«Амплитек»

А.В. Ходяков



КОПИЯ
ВЕРНА

ПАСПОРТ № 1179-24

Amplitech PneumoBact (R)

Набор реагентов для качественного определения ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech PneumoBact (R)) по ТУ 20.59.52-048-19926214-2024

REF P038-2

LOT 1179

 2024-11-12

 2025-11-12

Условия транспортирования: при температуре от 2 °С до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах.

Условия хранения: в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 до 75 % в защищенном от солнечного света месте.

Контроль качества набора проведен по ТУ 20.59.52-048-19926214-2024.

Состав набора и внешний вид компонентов

Лот компонента	Норма			Результат контроля
	наименование	количество	внешний вид	
00001	Смесь PneumoBact (RW)	0,96 мл x 1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло-серого до фиолетового цвета	Соответствует
00022	ВК	0,96 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
00046	ОК	0,8 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
00004	ПК R	0,8 мл x 1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость	Соответствует
–	Инструкция по применению	1 шт.	В электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/	Соответствует
–	Краткое руководство	1 шт.	В бумажном виде	Соответствует
–	Паспорт	1 шт.	В электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/	Соответствует

Упаковка набора

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

Маркировка набора

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

Функциональные характеристики набора

Показатель	Норма	Результат контроля
Предел обнаружения		
Выявление ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> и <i>Haemophilus influenzae</i> в концентрации 1000 ГЭ/мл	ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> и <i>Haemophilus influenzae</i> обнаружены.	Соответствует
Валидность результатов тестирования для исследуемых образцов	Последовательность ВК обнаружена.	Соответствует
Валидность результатов тестирования для контролей исследования (ОК, ПК)	Результаты соответствуют критериям оценки, указанным в инструкции по применению набора.	Соответствует

Заключение: Набор указанного лота соответствует требованиям ТУ 20.59.52-048-19926214-2024.

Дата выдачи паспорта: 12.11.2024

Руководитель ОКК, Романенкова Е.С.

