АмплиПрайм

IVD

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® *M. genitalium*»
по ТУ 21.20.23-105-09286667-2021

АмплиПрайм® *M. genitalium*

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

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

НекстБИО
Биотехнологическая компания

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ 3
1. НАЗНАЧЕНИЕ 4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 4
2.1.Формы выпуска, состав и комплектность 4
2.2.Принцип метода 6
2.3.Прослеживаемость значений калибраторов K1 complex, K2 complex 7
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА 7
3.1.Внутренний контроль качества 7
3.2.Рекомендуемые контрольные материалы 9
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ 9
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ 9
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ 11
6.1.Взятие исследуемого материала 11
6.2.Предварительная подготовка исследуемого материала 11
6.3.Экстракция ДНК из исследуемых образцов 12
6.4.Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов 12
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ 13
7.1.Отделяемое слизистой оболочки влагалища 13
7.2.Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала 14
7.3.Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры 14
7.4.Моча 15
7.5.Секрет предстательной железы 15
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 16
8.1.Экстракция ДНК из исследуемого материала 16
8.2.Подготовка реагентов для амплификации 17
8.3.Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции 17
8.4.Анализ и вычисление результатов 19
8.5.Интерпретация результатов 19
8.6.Возможные ошибки и рекомендации по их решению 21
8.7.Диагностическое значение полученного результата 22
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 22
9.1.Предел обнаружения 22
9.2.Линейный диапазон измерения и предел измерения 22
9.3.Аналитическая специфичность 23
9.4.Воспроизводимость и повторяемость измерения 23
9.5.Правильность измерения 24
9.6.Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность 24
9.7.Оценка влияния интерферирующих веществ 25
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА 26
10.1. Срок годности 26
10.2. Транспортирование 26
10.3. Хранение 26
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 26
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 27

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	–	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВЗОМТ	–	воспалительные заболевания органов малого таза
ВКО	–	внутренний контрольный образец
ГЭ	–	геномные эквиваленты
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	–	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	–	дезоксирибонуклеотидтрифосфат
ИППП	–	инфекции, передающиеся половым путем
К1	–	калибровочный образец 1
К2	–	калибровочный образец 2
К-	–	отрицательный контрольный образец ПЦР
ОКО	–	отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РУ	–	регистрационное удостоверение
ТУ	–	технические условия
УДГ	–	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® *M. genitalium*» по ТУ 21.20.23-105-09286667-2021.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® *M. genitalium*» предназначен для выявления и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* в биологическом материале (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), моча, секрет предстательной железы) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

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

1.3. Функциональное назначение: Набор предназначен для диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение ДНК *Mycoplasma genitalium* методом ПЦР в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для скринингового исследования биологического материала от всех групп населения, в том числе от лиц с подозрением на инфекции, передающиеся половым путем (ИППП) вне зависимости от формы и стадии заболевания, а также в комплексной диагностике заболеваний органов репродуктивной системы и в дифференциальной диагностике заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ) у женщин и для мониторинга терапии. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.5. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6. Потенциальные пользователи: Набор реагентов должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

1.7. Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

1.8. Противопоказания к применению: Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор выпускается в трёх формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все три формы предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

Форма выпуска 1 включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Форма выпуска 2 включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 3 включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь MG	0,01	100 пробирок	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана под парафин.
ПЦР-буфер-К	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
К1 complex	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 complex	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь MG	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-буфер-Н	0,65	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
К1 complex	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 complex	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 3			
ПЦР-смесь MG	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
ПЦР-буфер-К	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
К1 complex	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 complex	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

[1] Пробирки с голубым парафином не используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1, 2 или 3)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL[2]) и одновременной амплификации участка ДНК *Mycoplasma genitalium* и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в «реальном времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК *M. genitalium* основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). При проведении количественного теста амплификация ДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с калибраторами К1 complex и К2 complex – образцами с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Концентрация ДНК *M. genitalium* представлена абсолютным значением концентраций ДНК микроорганизмов, отражающим количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов в 1 мл биологического образца (ГЭ/мл).

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

[2] ВКО-FL входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

На этапе амплификации в одной пробирке одновременно амплифицируются участок ДНК *M. genitalium* и последовательность ВКО. Результаты амплификации регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G[3]
ДНК-мишень	ДНК *M. genitalium*	ДНК ВКО (экзогенный ВКО)
Область амплификации	*gyrB* gene	Искусственно синтезированная последовательность

2.3. Прослеживаемость значений калибраторов К1 complex, К2 complex

Измерение значений концентрации калибраторов К1 complex и К2 complex производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов К1 complex и К2 complex составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контрольный образец (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать: отрицательный контроль (К-) и положительные контроли (К1 complex и К2 complex). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК *M. genitalium*. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК *M. genitalium* и контроля, начиная с этапа экстракции.

[3] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow и VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Отрицательный контрольный образец (К-) тестируется, начиная с этапа амплификации, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК *M. genitalium*. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК *M. genitalium* и контроля, начиная с этапа амплификации.

В качестве положительного контроля используются реагенты К1 complex и К2 complex, входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации ДНК *M. genitalium* в исследуемых образцах проводится относительно количественно охарактеризованных калибровочных образцов К1 complex и К2 complex. Исследование калибровочных образцов К1 complex и К2 complex проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа ПЦР. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов К1 complex и К2 complex и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных образцов К1 complex и К2 complex и исследуемых образцов. Эффективность калибровки должна укладываться в заданный диапазон. Если эффективность калибровки выходит за пределы граничных значений, необходимо повторить исследование с этапа ПЦР.

3.1.3. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО, который добавляется в каждый исследуемый и отрицательный контрольный образец на этапе экстракции. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не обнаружена ДНК ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК *M. genitalium*.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО-FL. Без использования ВКО-FL невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. Набор предназначен для профессионального применения. Набор должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных 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 методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[4], биологический материал[5], включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Формы выпуска, состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08).

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

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

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

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

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

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

[5] Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (соскобного материала или отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта), содержащая буферно-солевой раствор с муколитиком, консервантом и стабилизатором (например, «Транспортная среда с муколитиком «АмплиПрайм ТСМ», РУ № ФСР 2012/14205 или другая, зарегистрированная в РФ).

6.1.2. Зонд для взятия биологического материала (соскобного материала или отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта) однократного применения, стерильный, изготовленный из полипропилена, состоящий из головки (рабочая часть) и ручки. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

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

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.2.1. Предварительная обработка мочи

6.2.1.1. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.1.2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.1.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

6.2.1.4. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.2.1.5. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала, содержащая консервант, или физиологический раствор (0,9 % раствор натрия хлорида) стерильный.

6.2.1.6. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.

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

6.2.1.8. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.2.1.9. Вортекс.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), моча, секрет предстательной железы) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;
- состав набора включает внутренний контрольный образец;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 100 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошел набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043).

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

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

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при работе с формой выпуска 2):

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

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

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

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

6.4.5. Вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при работе с формой выпуска 2 в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного типа (например, Rotor-Gene Q), либо планшетного типа (например, QuantStudio 5 или C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96), зарегистрированные в РФ и соответствующие следующим требованиям:

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

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;
- точность поддержания температуры ≤ ±0,4°C;
- скорость нагрева не менее 2 °C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °C/сек.

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °C.

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

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры);
- моча (осадок первой порции утренней мочи);
- секрет предстательной железы.

Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.1. Отделяемое слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести из заднебокового свода влагалища с помощью стерильного одноразового зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии инструкцией по применению зонда. Необходимо максимально полно собрать отделяемое. Рабочую поверхность зонда поместить в транспортную среду, обломав пластиковую основу. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Внимание! Во избежание контаминации, нельзя обрезать зонд ножницами!

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 45 дней;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.2. Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном.

Взятие материала провести из цервикального канала с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощетки или универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии с инструкцией по применению цитощетки / зонда. При использовании универсального зонда объем соскобного отделяемого будет меньше. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 45 дней;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.3. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

Взятие эпителиального соскоба из уретры проводить с помощью стерильного одноразового универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии с инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 45 дней;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.4. Моча

7.4.1. Порядок сбора

У женщин для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон или контейнер объемом 50-60 мл. Сбор мочи провести после тщательного туалета наружных половых органов. Желательно закладывать тампон во влагалище перед сбором материала для предупреждения контаминации мочи отделяемым из влагалища. Также не следует производить сбор мочи во время менструации.

У мужчин при мочеиспускании необходимо освободить наружное отверстие мочеиспускательного канала, полностью оттянув кожную складку. Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15–25 мл в специальный сухой стерильный флакон на 50–60 мл.

В случае если сбор мочи осуществляется в емкость без реагентов для консервации и стабилизации, допускается хранение и транспортирование образцов мочи до проведения предобработки:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

При осуществлении сбора мочи в емкость с транспортной средой или реагентами для консервации и стабилизации, хранение образцов мочи до проведения предобработки проводить согласно инструкции к используемой емкости для сбора.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.4.2. Предварительная обработка

Флакон с мочой взболтать. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 5 мин при 10 000 g. При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл физиологического раствора стерильного или транспортной среды и затем снова концентрировать. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить супернатант, используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра, не захватывая осадок. К осадку добавить 200 мкл физиологического раствора стерильного или транспортную среду в объеме, указанном в инструкции по ее применению. Тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Условия хранения предварительно обработанных проб мочи аналогичны условиям хранения материала до предобработки.

7.5. Секрет предстательной железы

Перед получением секрета предстательной железы головку полового члена обработать стерильным ватным тампоном. Секрет простаты забрать после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. После окончания массажа предстательной железы ее секрет в количестве 0,5–1 мл собрать в одноразовую стерильную сухую пластиковую пробирку объемом 2 мл или стерильный сухой контейнер объемом 50–60 мл.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, и промаркировать.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

При невозможности получить секрет сразу после массажа простаты собрать первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 15–25 мл (см. порядок забора мочи).

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

- при комнатной температуре (до 25 °С) – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории[6]:

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

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

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

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

Экстракцию ДНК из каждого исследуемого образца и контролей необходимо проводить в присутствии ВКО. Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) в одном повторе.

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

- объем реагента ВКО-FL – **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольными образцами;
- объем исследуемого образца – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **100 мкл** (согласно инструкции по применению к используемому набору для экстракции НК).

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

8.2.1. При использовании формы выпуска 1

8.2.1.1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью MG** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.1.2. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.1.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

8.2.2. При использовании формы выпуска 2

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

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

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

Таблица 5

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь MG	**10,0***(N+1)	**N** – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	**5,0***(N+1)	

8.2.2.2. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью MG** и **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.

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

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.2.3. При использовании формы выпуска 3

8.2.3.1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью MG** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.3.2. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.3.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

8.3.2. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью контрольные образцы.

При проведении качественного анализа:

а) положительный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К2** внести **10 мкл К2 complex**.

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

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

При проведении количественного анализа:

а) Образец **К1** – в одну пробирку внести **10 мкл К1 complex**.

б) Образец **К2** – в одну пробирку внести **10 мкл К2 complex**.

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

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

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

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[7]	

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

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

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

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

[7] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow и VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.4. Анализ и вычисление результатов

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/.

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

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по двум каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G[8]
Продукт амплификации	ДНК *M. genitalium*	ВКО-FL

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и заданных значений концентраций для калибраторов строится калибровочная кривая, по которой проводится автоматический расчет значений концентрации геномных эквивалентов ДНК *M. genitalium* в 1 мл биологического образца (ГЭ/мл).

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- в качественном формате вручную в соответствии с таблицей 8 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 10;

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 9 и 10 соответственно.

[8] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow и VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 8

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM не определено** и по каналу для флуорофора **R6G не определено или определено выше граничного**[9]	**Невалидный!** Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного**. При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции	**ДНК *M. genitalium* обнаружена**
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM не определено,** а по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного**	**ДНК *M. genitalium* не обнаружена**
Значения Ct по каналу для флуорофора **FAM определено выше граничного**, а по каналу для флуорофора **R6G не выше граничного**	**Результат недостоверный/сомнительный**

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM не определено** и по каналу для флуорофора **R6G не определено или определено выше граничного**[9]	**Невалидный!** Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM не определено,** а по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного**	**ДНК *M. genitalium* не обнаружена**
Рассчитанное значение концентрации **ДНК** по каналу для флуорофора **FAM меньше нижнего предела линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного**	**ДНК *M. genitalium* обнаружена в концентрации менее 2 х 10^3 ГЭ/мл** для соскобного материала или отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, секрета предстательной железы **или менее 4 х 10^3 ГЭ/мл** для образцов мочи
Рассчитанное значение концентрации **ДНК** по каналу для флуорофора **FAM** находится **в пределах линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного**	**ДНК *M. genitalium* обнаружена в концентрации Хх10^y ГЭ/мл**
Рассчитанное значение концентрации **ДНК** по каналу для флуорофора **FAM выше верхнего предела линейного диапазона измерения** набора, при этом значение Ct по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного**	**ДНК *M. genitalium* обнаружена в концентрации более 1х10^7 ГЭ/мл**

[9] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 10

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора	
	FAM	R6G
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного[10]
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует	
К1 complex (К1)	Определено значение Ct	
К2 complex (К2)	Определено значение Ct не выше граничного	
К1 complex (К1) К2 complex (К2)	Показатель эффективности (Е) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2	

8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению

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

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналу для флуорофора FAM, и/или R6G/HEX/JOE/VIC определено значение порогового цикла (Ct). 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 исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма, начиная с этапа амплификации ДНК.

8.6.3. Если показатель эффективности Е для калибраторов не укладывается в диапазон 0,8 – 1,2, необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях ДНК-калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

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

8.6.5. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие, предварительную подготовку и исследование образца.

[10] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.7. Диагностическое значение полученного результата

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения[11]

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 11).

Значения характеристики, указанные в таблице 11, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 11

Предел обнаружения набора

Биологический материал	Предел обнаружения по Probit 95%, ГЭ/мл	95%-ый доверительный интервал, ГЭ/мл
Соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры)	$1x10^3$	$8,93x10^2 – 1,7x10^3$
Секрет предстательной железы	$1x10^3$	$8,67x10^2 – 1,24x10^3$
Моча	$2x10^3$	$1,71x10^3 – 2,44x10^3$

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор «АмплиПрайм® *M. genitalium*» дает линейный ответ, приведен в таблице 12. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 12

Линейный диапазон измерения набора

Биологический материал	Линейный диапазон измерения, ГЭ/мл
Соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), секрет предстательной железы	$2x10^3 – 1x10^7$
Моча	$4x10^3 – 1x10^7$

[11] Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация кДНК выявляемых возбудителей, при которой 95% тестов дают положительный результат).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.3. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® *M. genitalium*» обнаруживает только фрагмент ДНК *M. genitalium*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов и вирусов (см. таблицу 13) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее $1x10^6$ ГЭ/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК *M. genitalium*.

Таблица 13

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
Gardnerella vaginalis	*Neisseria subflava*
Lactobacillus spp.	*Neisseria sicca*
Enterococcus faecium	*Neisseria gonorrhoeae*
Escherichia coli	*Neisseria mucosa*
Staphylococcus spp.	*Treponema pallidum*
Streptococcus spp.	*Toxoplasma gondii*
Candida albicans	*Trichomonas vaginalis*
Mycoplasma hominis	HSV I
Chlamydia trachomatis	HSV II
Ureaplasma urealyticum	CMV
Ureaplasma parvum	HPV 16
Neisseria flava	-

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и вирусов, и геномной ДНК человека с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений с помощью набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*» оценивали путем тестирования разведений модельных образцов в трех диапазонах концентраций (см. таблицу 14 и 15). Модельные образцы были приготовлены разведением стандартного образца предприятия, содержащего ДНК *M. genitalium*, в биологическом материале. Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 48 повторах, для оценки воспроизводимости – в 96 повторах.

Таблица 14

Повторяемость измерения

Исходное значение концентрации ДНК *M. genitalium*, ГЭ/мл	**Среднее измеренное значение концентрации, log_{10}**	**Стандартное отклонение (SD), log_{10}**	**Коэффициент вариации (CV), %**
$1,0x10^4 – 3,0x10^4$	4,20	0,087	2,07
$1,0x10^5 – 3,0x10^5$	5,19	0,090	1,74
$1,0x10^6 – 3,0x10^6$	6,17	0,087	1,41

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 15

Воспроизводимость измерения

Исходное значение концентрации ДНК *M. genitalium*, ГЭ/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log_{10}	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
$1,0x10^4 – 3,0x10^4$	4,29	0,19	4,41
$1,0x10^5 – 3,0x10^5$	5,34	0,22	4,07
$1,0x10^6 – 3,0x10^6$	6,34	0,24	3,84

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с помощью набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*» была определена путем тестирования стандартного образца предприятия в 120 повторах (см. таблицу 16).

Таблица 16

Правильность измерения

Среднее значение концентрации ДНК *M. genitalium*, log_{10}	Установленное значение концентрации, log_{10}	Систематическая погрешность (B)	
		log_{10}	%
5,74	5,7	0,04	0,6

9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*» были использованы по 700 образцов каждого вида биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов.

В качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали наличие/отсутствие ДНК *M. genitalium* использовался набор реагентов «АмплиПрайм® *NCMT*» (РУ № РЗН 2015/3168).

Таблица 17

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования		
Тип	Количество	Образцы	АмплиПрайм® *M. genitalium*	Набор сравнения
Соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	700	Положительных	152	152
		Отрицательных	548	548
Моча	700	Положительных	150	150
		Отрицательных	550	550
Секрет предстательной железы	700	Положительных	150	150
		Отрицательных	550	550

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 18.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 18

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® *M. genitalium*»

Тип образцов	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	100 % (99,5 – 100) %	100 % (98,0 – 100) %
Моча	100 % (99,5 – 100) %	100 % (98,0 – 100) %
Секрет предстательной железы	100 % (99,5 – 100) %	100 % (98,0 – 100) %

9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом материале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 19, в максимально возможной концентрации для каждого вида биоматериала.

Таблица 19

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*»

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
Моча	муцин	0,23 мг/100 мкл
	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	мочевина	0,033 ммоль/100 мкл
Секрет предстательной железы	муцин	0,23 мг/100 мкл
	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	мочевина	0,033 ммоль/100 мкл

Отсутствие влияния интерферирующих веществ для образцов отделяемого слизистой оболочки урогенитального тракта (лубриканты, семенная жидкость, антисептик «Мирамистин», итраконазол, метронидазол, мочевина, муцин, гемоглобин, гормоны дидрогестерон и прогестерон) было показано в испытаниях с использованием набора для экстракции «МагноПрайм ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

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

10.2. Транспортирование

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

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

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

10.3. Хранение

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

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

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

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

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

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Не допускать попадания солнечного света
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® *M. genitalium*»
по ТУ 21.20.23-105-09286667-2021

«АмплиПрайм® *M. genitalium*»

Форма выпуска 1

REF P2062-41

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

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим свободный бесперебойный доступ в интернет).

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры);
- ✓ моча;
- ✓ секрет предстательной железы.

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь MG	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин	0,01	100 пробирок
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,20	1 пробирка
К1 complex	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
К2 complex	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
ОКО	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка
К-	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 1
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С … 8°С в защищенном от света месте

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО-FL[1]	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью MG для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
2. Внести в подготовленные пробирки ПЦР-буфер-К и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфер-К	в пробирки с ПЦР-смесью MG на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** ПЦР-буфер-К не должен проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К-	в пробирку для образца К- (отрицательного контроля ПЦР)
К2 complex *(при проведении качественного и количественного анализа)*	в пробирку для образца К2
К1 complex *(при проведении только количественного анализа)*	в пробирку для образца К1

3. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

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

[1] ВКО-FL входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

4. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® *M. genitalium*»
по ТУ 21.20.23-105-09286667-2021

«АмплиПрайм® *M. genitalium*»

Форма выпуска 2

REF 2062-42

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

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим свободный бесперебойный доступ в интернет).

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры);
- ✓ моча;
- ✓ секрет предстательной железы.

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь MG	Прозрачная жидкость	1,20	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная жидкость	0,65	1 пробирка
К1 complex	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
К2 complex	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
ОКО	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка
К-	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 2
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С … 8°С в защищенном от света месте

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО-FL[1]	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	**Объем, мкл**	**Обозначения**
ПЦР-смесь MG	**10,0***(N+1)	**N** – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	**5,0***(N+1)	

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

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

2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью MG и ПЦР-буфером-Н, осадить капли на вортексе.

3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

5. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки для исследуемых и контрольных образцов
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К-	в пробирку для образца К- (отрицательного контроля ПЦР)
К2 complex *(при проведении качественного и количественного анализа)*	в пробирку для образца К2
К1 complex *(при проведении только количественного анализа)*	в пробирку для образца К1

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

[1] ВКО-FL входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

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

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

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

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Краткое руководство

по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Mycoplasma genitalium* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® *M. genitalium*»
по ТУ 21.20.23-105-09286667-2021

«АмплиПрайм® *M. genitalium*»

Форма выпуска 3

REF P2062-43

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

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим свободный бесперебойный доступ в интернет).

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (отделяемое слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала и соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры);
- ✓ моча;
- ✓ секрет предстательной железы.

СОСТАВ

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь MG	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,20	1 пробирка
К1 complex	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
К2 complex	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
ОКО	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка
К-	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 3
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С … 8°С в защищенном от света месте

[1] Пробирки с голубым парафином не используются.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® *M. genitalium*». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО-FL[2]	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с ПЦР-смесью MG для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
2. Внести в подготовленные пробирки ПЦР-буфер-К и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфер-К	в пробирки с ПЦР-смесью MG на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** ПЦР-буфер-К не должен проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К-	в пробирку для образца К- (отрицательного контроля ПЦР)
К2 complex *(при проведении качественного и количественного анализа)*	в пробирку для образца К2
К1 complex *(при проведении только количественного анализа)*	в пробирку для образца К1

3. При ручном анализе запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

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

[2] ВКО-FL входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

[3] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

ВНИМАНИЕ! При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

4. Установить стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru