

Amplitech UP/UU/MH

Набор реагентов для количественного определения ДНК *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech UP/UU/MH) по ТУ 21.20.23-022-19926214-2023

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

IVD

REF P014-0

 96

СОДЕРЖАНИЕ

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

ВВЕДЕНИЕ

1. Настоящая инструкция по применению версии 12.04.23 распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для количественного определения ДНК *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech UP/UU/MH) по ТУ 21.20.23-022-19926214-2023» (далее – набор).

Краткое наименование набора: Amplitech UP/UU/MH.

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. Условно-патогенные микоплазмы (*Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*) могут встречаться в урогенитальном тракте в условиях нормы. Для данных микроорганизмов качественный результат выявления не является информативным. Набор реагентов «Amplitech UP/UU/MH» позволяет дифференцированно выявлять ДНК условно-патогенных микоплазм в количественном формате с определением превышения порогов клинической значимости их концентраций.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

Набор предназначен для лабораторной диагностики *in vitro* (выявление и количественное определение *U. parvum*, *U. urealyticum*, *M. hominis*). 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 женщин с подозрением на наличие воспалительных инфекционных заболеваний мочеполовой системы. Отрицательные результаты исследования с помощью набора не исключают возможность инфицирования *U. parvum*, *U. urealyticum*, *M. hominis* и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациента. Отрицательные результаты исследования должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Набор может применяться в клинико-диагностических лабораториях.

3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания к применению набора отсутствуют.

4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ

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

5 СОСТАВ

Состав набора¹ указан в таблице 1.

Таблица 1

Состав набора

Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
Смесь-1 У/МН (Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ)	0,48	1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло-розового до фиолетового цвета
Смесь-2 В (Буферный раствор с сульфатом магния, термостабильной ДНК-полимеразой)	0,48	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость

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

Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
ВК U (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с ДНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК U (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами ДНК выявляемых микроорганизмов)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	–	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	–	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	–	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.

6 ПРИНЦИП МЕТОДА

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

Таблица 2

Каналы детекции мишеней

Канал детекции сигнала от флуорофора	Мишень	Область амплификации
FAM	ДНК <i>U. parvum</i>	<i>UreC</i> gene
R6G ³	ДНК <i>U. urealyticum</i>	<i>UreC</i> gene
ROX	ДНК <i>M. hominis</i>	16S рРНК
Сy5	ДНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность

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

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

³ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров Нех и Джо.

6.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК U

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

7 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются следующие оборудование и материалы:

- 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 № ФСЗ 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH; РУ № ФСЗ 2010/07595));
- штатив для пробирок объёмом 0,2 и 1,5 мл;
- 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 амплификаторов планшетного типа;
- пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл с плоской крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз, при использовании амплификаторов роторного типа;
- пробирки объёмом 1,5 мл, одноразовые, свободные от ДНКаз, для приготовления реакционной смеси;
- наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 10, 100 и 200 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз;
- ёмкость для сброса использованных материалов;
- перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

8 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

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

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Утилизировать реагенты (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения) в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» к утилизации медицинских отходов класса Г.

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

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

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

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

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

- Не использовать набор по истечении срока годности.

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

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

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

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

При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

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

9 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

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

- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»;
- МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории»;
- требованиями, перечисленными в таблицах 3 и 4.

Таблица 3

Требования к взятию и предварительной обработке исследуемого материала

Взятие мазков со слизистой оболочки влагалища
Взятие материала провести с помощью стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А5 универсальный» или «Зонд тип А1 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).
Взятие соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала
Взятие материала провести с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощётки (например, «Зонд тип F3 комбинированный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) или стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А1 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).
Взятие соскобов эпителия со слизистой оболочки уретры
Взятие материала провести с помощью стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А3 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).
Взятие и предобработка мочи
Отобрать первую порцию утренней мочи в количестве от 15 до 25 мл в специальную одноразовую ёмкость. Предобработка: Взболтать ёмкость с мочой. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку. Центрифугировать 5 мин при 10000 x g. Не захватывая осадок, полностью удалить супернатант, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник без фильтра для каждого образца. При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в 1 мл физиологического раствора

стерильного, затем снова концентрировать центрифугированием и удалить супернатант, не захватывая осадок.

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

Таблица 4

Требования к условиям транспортирования и хранения исследуемого материала

Условия транспортирования	Условия хранения
Исследуемые материалы, помещённые в транспортную среду	
Согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается однократное замораживание материала.	
Моча	
При температуре от 2 °С до 8 °С	До и после предобработки: <ul style="list-style-type: none">• при температуре от 2 °С до 8 °С не более суток;• при температуре минус 20 °С не более недели;• при температуре минус 70 °С длительно;• Допускается однократное замораживание материала.

10 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1 Экстракция ДНК

Провести экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей с использованием набора реагентов для экстракции ДНК из соответствующих видов биоматериала, например, «ДНК-100» (ООО «Ампитек»)⁴, согласно инструкции по его применению, с учётом требований к объёмам реагентов и образцов, указанных в таблице 5.

Таблица 5

Требования к объёмам реагентов и образцов при экстракции ДНК

Реагент/образец	Объём, мкл	Пробирка/ячейка планшета для проведения экстракции ДНК
ВК U ⁵	10	в каждую пробирку/ячейку
Исследуемый образец ⁶	100	в пробирку/ячейку для образца исследуемого материала
ОК	100	в пробирку/ячейку для отрицательного контроля (ОК)
ПК U	100	в пробирку/ячейку для положительного контроля (ПК)
Реагент для элюции ДНК	100	в каждую пробирку/ячейку

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

⁴ В ходе проведения клинических испытаний набор был валидирован с набором реагентов «ДНК-100» (ООО «Ампитек»).

⁵ При экстракции с помощью набора реагентов «ДНК-100» (ООО «Ампитек») ВК U можно не добавлять, так как внутренний контроль входит в состав Буфера А1.

⁶ Для образцов мочи необходимо провести предобработку согласно разделу 9.

10.2 Подготовка к проведению ПЦР

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

10.2.1 Перемешать содержимое пробирок Смесь-1 У/МН, Смесь-2 В и осадить капли на вортексе.

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

Таблица 6

Объёмы компонентов реакционной смеси

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

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

10.2.4 Внести в пробирки по 10 мкл приготовленной реакционной смеси.

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

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

10.3 Проведение ПЦР и детекции

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

Таблица 7

Программа ПЦР и детекции

Цикл	Температура, °С	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 ⁷ , ROX, Cy5	

Примечания

1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.

2) При одновременном проведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °С – 15 мин» для экономии времени.

⁷ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров Hex и Joe.

3) Детекция может назначаться по другим каналам, помимо указанных, при одновременном проведении в одном приборе нескольких тестов с использованием указанной программы.

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

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

11 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1 Учёт результатов осуществляется с помощью программного обеспечения используемого амплификатора согласно инструкции по его применению. Рекомендуется выставлять пороговую линию на уровне 10 % от разгорания положительного контроля. Кривые флуоресценции, пересекающие пороговую линию, должны иметь сигмообразную форму.

11.2 Проверить наличие значений C_t для исследуемого образца по каналам FAM, R6G, ROX (соответствие мишеней и каналов детекции см. в таблице 2).

11.3 При наличии значений C_t по каналам FAM/R6G/ROX рассчитать концентрацию ДНК выявленного возбудителя согласно формуле (1).

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

где $C_{\text{ДНК возб}}$ – концентрация ДНК выявленного возбудителя, копий/мл;

ΔC_t – разность между значением C_t для исследуемого образца и значением C_t для ПК U по каналу FAM/R6G/ROX.

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

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

где $C_{\text{ГЭ}}$ – концентрация ДНК выявленного возбудителя, ГЭ/мл;

$C_{\text{ДНК возб}}$ – концентрация ДНК выявленного возбудителя, копий/мл;

K – коэффициент пересчёта концентрации ДНК возбудителя из копий/мл в ГЭ/мл (см. таблицу 8).

Таблица 8

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

Возбудитель	Коэффициент пересчёта
<i>Ureaplasma parvum</i>	1
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1
<i>Mycoplasma hominis</i>	2

11.5 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 9.

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
По каналу Су5 значение Ct определено не больше граничного ⁸ . По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют.	ДНК <i>U. parvum</i> , <i>U. urealyticum</i> , <i>M. hominis</i> в образце <i>не выявлены</i> .
Рассчитано значение концентрации ДНК возбудителя, укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК возбудителя в образце <i>выявлена</i> в концентрации в пределах диапазона измерения набора.
Рассчитано значение концентрации ДНК возбудителя, не укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК возбудителя в образце <i>выявлена</i> в концентрации вне пределов диапазона измерения набора.
По каналу Су5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют.	Невалидный результат

Клинически значимой является концентрация ДНК *U. parvum/ U. urealyticum/ M. hominis* свыше 10000 ГЭ/мл.

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

Таблица 10

Критерии оценки для контролей

Контроль	Норма
ОК	По каналу Су5 значение Ct определено не больше граничного ⁸ . По каналам FAM, R6G, ROX значение Ct отсутствует.
ПК U	По каналам FAM, R6G, ROX, Су5 значение Ct определено не больше граничного.

12 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

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

Таблица 11

Рекомендации по устранению ошибок

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для ПК значение Ct по каналу FAM и/или R6G и/или ROX и/или Су5 отсутствует или определено больше граничного ⁸ .	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК по каналу Су5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного.	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

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

13 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

13.1 Контроли, используемые в процессе исследования

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

13.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

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

13.1.2 Внутренний контроль

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

13.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

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

13.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

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

14 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА⁹

14.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора указан в таблице 12.

Таблица 12

Предел обнаружения		
Мишень	Предел обнаружения, ГЭ/мл	95 %-ый ДИ, ГЭ/мл
ДНК <i>U. parvum</i>	1000	440 – 1919
ДНК <i>U. urealyticum</i>	1000	557 – 1785
ДНК <i>M. hominis</i>	500	214 – 607

14.2 Диапазон измерения и предел измерения

Диапазон измерения и предел измерения набора указаны в таблице 13.

Таблица 13

Диапазон измерения и предел измерения		
Мишень	Диапазон измерения, ГЭ/мл	Предел измерения, ГЭ/мл
ДНК <i>U. parvum</i>	$3 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^3$
ДНК <i>U. urealyticum</i>	$3 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^3$
ДНК <i>M. hominis</i>	$1,5 \cdot 10^3 - 2,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^3$

14.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 14, и геномной ДНК человека. ДНК

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

микроорганизмов исследовалась в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл, геномная ДНК человека - в концентрации 1 мкг/мл. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 14

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

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

14.3.1 Потенциально интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующие вещества (ингибиторы ПЦР) и их максимальные концентрации в образце, для которых оценивалось их ингибирующее влияние на ПЦР, перечислены в таблице 15.

Таблица 15

Потенциально интерферирующие вещества

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

Наличие возможного ингибирующего эффекта оценивалось путём проведения процедуры экстракции ДНК¹⁰ из модельных образцов биологического материала, в которые добавлялись потенциальные интерференты в концентрациях согласно таблице 15 и стандартные образцы предприятия, содержащие ДНК выявляемых микроорганизмов. Далее с экстрагированными образцами проводили ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» с использованием набора реагентов «Amplitech UP/UU/MH».

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

¹⁰ Экстракция проводилась с использованием набора реагентов «ДНК-100» (ООО «Ампитек»).

14.4 Прецизионность измерения

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

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

14.5 Правильность измерения

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

14.6 Диагностическая специфичность

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

Таблица 16

Диагностическая специфичность

Исследуемый материал	Мишень	Количество отрицательных образцов	ДС, %
Мазки со слизистой оболочки влагалища	ДНК <i>U. parvum</i>	210	98,6 – 100
	ДНК <i>U. urealyticum</i>	210	98,6 – 100
	ДНК <i>M. hominis</i>	210	98,6 – 100
Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала	ДНК <i>U. parvum</i>	210	98,6 – 100
	ДНК <i>U. urealyticum</i>	210	98,6 – 100
	ДНК <i>M. hominis</i>	210	98,6 – 100
Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры	ДНК <i>U. parvum</i>	210	98,6 – 100
	ДНК <i>U. urealyticum</i>	210	98,6 – 100
	ДНК <i>M. hominis</i>	210	98,6 – 100
Моча (осадок первой порции)	ДНК <i>U. parvum</i>	210	98,6 – 100
	ДНК <i>U. urealyticum</i>	210	98,6 – 100
	ДНК <i>M. hominis</i>	210	98,6 – 100

14.7 Корреляция

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

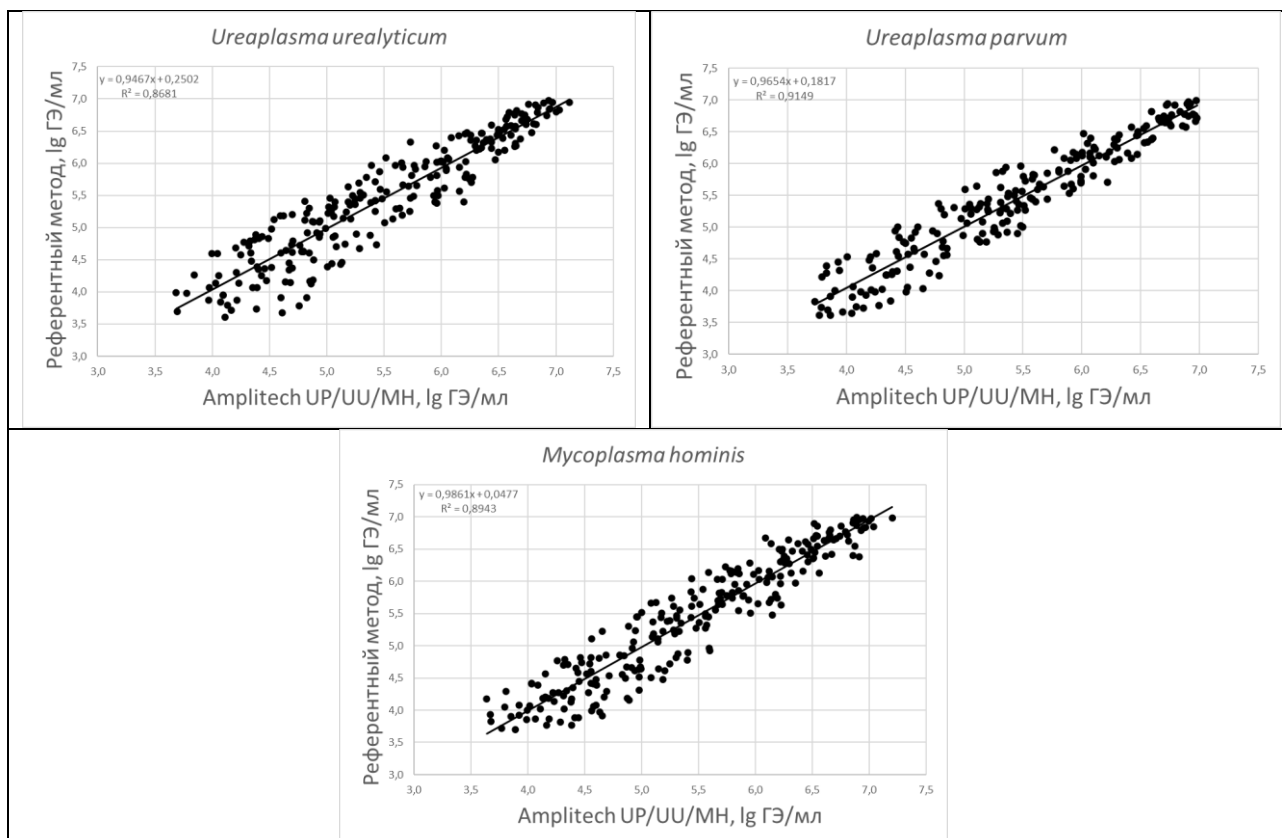


Рисунок 1

15 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

15.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора.

15.2 Хранение

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

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

15.3 Транспортирование

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

15.4 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 %.

16 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

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

17 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.

18 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

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

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

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

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

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

19 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

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

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

20 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

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

21 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Изготовитель



Номер по каталогу



Дата изготовления



Код серии



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Обратитесь к инструкции по применению



Предел температуры



Содержимого достаточно для проведения тестов



Не допускать воздействия солнечного света



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