

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека (ФБУН
ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора)



А.В. Горелов

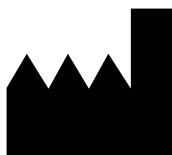
2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ.....	9
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	12
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	13
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	13
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F)	15
СОСТАВ	15
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	16
А. Подготовка проб для амплификации	16
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ...	17
В. Анализ и интерпретация результатов	18
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	23
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
K1, K2	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
ПКО	- положительный контрольный образец
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
рРНК	- рибосомная рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»
ML	- макролиды
FQ	- фторхинолоны

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов АмплиСенс[®] *M.genitalium*-ML/FQ-Resist-FL предназначен для выявления мутаций в ДНК *M.genitalium*, связанных с устойчивостью к макролидам (в области V домена гена 23S рРНК) и фторхинолонам (в области QRDR гена ParC), в пробах ДНК, экстрагированных из биологического материала (отделяемое слизистой оболочки уретры, отделяемое цервикального канала, отделяемое влагалища, образцах мочи), методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Набор реагентов рекомендуется использовать после обнаружения ДНК *M.genitalium* в исследуемых образцах с помощью наборов реагентов производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых

лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц, инфицированных *M.genitalium*, с целью правильного и своевременного назначения соответствующей схемы терапии инфекции, вызванной *M.genitalium*.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на одновременной амплификации участков ДНК *M.genitalium*, включающих области расположения анализируемых мутаций, ассоциированных с устойчивостью *M.genitalium* к макролидам и фторхинолонам, и ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО)¹ с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального 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 Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые

¹ ВКО добавляется на этапе экстракции ДНК *M.genitalium* при исследовании образцов с помощью наборов реагентов для выявления ДНК *M.genitalium* производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

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».

Для выявления мутаций используются олигонуклеотидные зонды, комплементарные ДНК *M.genitalium* дикого типа. Такой подход позволяет выявлять максимальный спектр целевых мутаций.

Выявление мутаций, ассоциированных с устойчивостью *M.genitalium* к макролидам и фторхинолонам, для одного образца проводится в двух пробирках. В первой пробирке определяется ДНК *M.genitalium* (ген *gyrB*) и наличие (или отсутствие) мутаций устойчивости к макролидам (в области V домена гена 23S рРНК), во второй пробирке определяется ДНК ВКО и наличие (или отсутствие) мутаций устойчивости к фторхинолонам (в области QRDR гена *ParC*). Результаты амплификации анализируемых участков генов *M.genitalium*, а также ДНК ВКО регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
Наименование ПЦР-смеси-FL	Выявляемая ДНК-мишень		
ПЦР-смесь-FL Mg/ML	область V домена гена 23S rRNA (дикий тип)	-	ген <i>gyrB</i>
ПЦР-смесь-FL Mg/FQ	-	область QRDR гена <i>ParC</i> (дикий тип)	ДНК ВКО (искусственная нуклеотидная последовательность)

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F; программное обеспечение АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist версия 1.0

Форма 1 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме

«реального времени» и позволяет выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК.

Форма 1 рассчитана на проведение 110 реакций амплификации (всего 55 тестов), включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), ГЭ/мл
Проба ДНК, полученная путем экстракции из биологического материала	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	1×10^3

ВНИМАНИЕ! Выявление мутаций в ДНК *M.genitalium*, связанных с устойчивостью к макролидам (в области V домена гена 23S рРНК) и фторхинолонам (в области QRDR гена ParC) возможно при концентрации ДНК *M.genitalium* в образце не менее 1×10^3 ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК *M.genitalium*. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов/штаммов в концентрации не менее 1×10^7 ГЭ/мл: *Lactobacillus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Enterococcus faecium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, HSV (вирус простого герпеса) 1 и 2 типа, CMV (цитомегаловирус), *Atopobium vaginae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, *Enterobacter cloacae*, а также геномной ДНК человека в концентрации не менее 1×10^7 ГЭ/мл.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было. Специфичность тестирования подтверждалась методом секвенирования детектируемых продуктов амплификации.

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

Повторяемость, воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительные образцы представляли собой смесь стандартных образцов предприятия, содержащих участки ДНК *M.genitalium*, имеющие мутации устойчивости к макролидам и фторхинолонам, в концентрациях 1×10^5 копий/мл. В качестве образцов, не содержащих целевые мутации, были использованы стандартные образцы предприятия, содержащие участки ДНК *M.genitalium* дикого типа в концентрациях 1×10^5 копий/мл.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Воспроизводимость исследования

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	20	100	40	100
Отрицательные	20	100	40	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностической чувствительности набора реагентов АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist-FL было протестировано 300 образцов ДНК, содержащих ДНК *M.genitalium*, экстрагированных из отделяемого уrogenитального тракта и мочи. Образцы были независимо протестированы набором реагентов АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist-FL и референтным методом – секвенированием по Сэнгеру.

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist-FL в сравнении с референтным методом

Тип образцов	Группа антибиотиков	Результаты применения АмплиСенс® <i>M.genitalium</i> -ML/FQ-Resist-FL		Результаты применения референтного метода ²	
				Мутации устойчивости к антибиотикам обнаружены (положительные)	Мутации устойчивости к антибиотикам не обнаружены (отрицательные)
Образцы ДНК, экстрагированные из биологического материала	Макролиды	Всего исследовано 300 образцов	Обнаружены мутации (положительные)	25	0
			Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	275
	Фторхинолоны	Всего исследовано 300 образцов	Обнаружены мутации (положительные)	15	0
			Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	285

² В качестве референтного метода использовался метод прямого секвенирования по Сэнгеру.

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist-FL**

Тип образцов	Группа антибиотиков	Диагностическая чувствительность ³ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ⁴ , (с доверительной вероятностью 95 %)
Образцы ДНК, экстрагированные из биологического материала	Макролиды	100 (88,7-100) %	100 (98,9-100) %
	Фторхинолоны	100 (81,9-100) %	100 (99-100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

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 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» 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».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп

³ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁴ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁵, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

⁵ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека.

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

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Аmplификация с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

1. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» FRT-50 F:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные).
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
5. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
6. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
7. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) и другие, рекомендованные Изготовителем).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат пробы ДНК, полученные ранее на этапе экстракции из исследуемого материала, в которых обнаружена ДНК *M.genitalium*.

Допускается хранение образцов ДНК *M.genitalium* до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – 1 неделя;
- при температуре от минус 24 до минус 16°С – в течение года.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

В ходе анализа рисков были определены следующие особенности состава набора реагентов и конфигурации анализа, которые позволяют исключить влияние потенциально интерферирующих веществ на метод полимеразной цепной реакции:

- использование в качестве исследуемых образцов проб ДНК, полученных ранее на этапе экстракции из исследуемого материала, в которых уже была обнаружена ДНК *M.genitalium*;
- использование специфичных праймеров и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, комплементарных участкам выявляемых ДНК-мишеней;
- детекция искусственной нуклеотидной последовательности ДНК ВКО в качестве экзогенного внутреннего контроля.

В случае отсутствия сигнала ДНК ВКО и ДНК *M.genitalium*, результат анализа считается невалидным.

В виду указанных особенностей состава набора реагентов и конфигурации анализа, изучение интерферирующих свойств отдельных компонентов биологического образца не требуется.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- амплификация ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F) СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *M.genitalium* (гены 23S рРНК, ParC и gyrB) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL Mg/ML	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-FL Mg/FQ	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К1 Mg/ML	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 Mg/ML	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К1 Mg/FQ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К2 Mg/FQ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации (всего 55 тестов), включая контроли.

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

Программное обеспечение АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist версия 1.0 в формате Microsoft® Excel для автоматической обработки результатов и руководство оператора.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

А. Подготовка проб для амплификации

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

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления двух реакционной смесей. На одну реакцию требуется **10 мкл ПЦР-смеси-FL Mg/ML** или **ПЦР-смеси-FL Mg/FQ**, **5 мкл ПЦР-буфера-В** и **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на 1 реакцию.

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

2. Перемешать содержимое пробирок с указанными **ПЦР-смесями-FL**, **ПЦР-буфером-В**, **полимеразой (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
3. В двух отдельных пробирках подготовить две реакционные смеси. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-FL Mg/ML** или **ПЦР-смеси-FL Mg/FQ**, **ПЦР-буфера-В** и **Полимеразы (TaqF)**, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое (двухкратное) количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб, поставить в два ряда.
5. В каждый ряд пробирок внести по одной из двух приготовленных реакционных смесей по **15 мкл** на пробу. Неиспользованные остатки реакционных смесей выбросить.
6. В две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Объем экстрагированной пробы ДНК *M.genitalium*, предназначенной для исследования, должен быть не менее **20 мкл**.

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

7. Поставить контрольные реакции.

Для ПЦР-смеси-FL Mg/ML:

- а) ДНК-калибратор K1 – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K1 Mg/ML.
- б) ДНК-калибратор K2 – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K2 Mg/ML.
- в) отрицательный контроль ПЦР (K–) – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл K–.

Для ПЦР-смеси-FL Mg/FQ:

- а) ДНК-калибратор K1 – в пробирку с реакционной смесью, содержащей ПЦР-смесь-FL Mg/FQ, внести 10 мкл K1 Mg/FQ.
- б) ДНК-калибратор K2 – в пробирку с реакционной смесью, внести 10 мкл K2 Mg/FQ.
- в) отрицательный контроль ПЦР (K–) – в пробирку с реакционной смесью, внести 10 мкл K–.

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

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 6).

Таблица 6

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	-	1
2	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
3	95	5 с	-	40
	60	20 с	FAM, JOE и ROX	
	72	15 с	-	

Примечание – при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Анализ полученных результатов проводят автоматически, с помощью программного обеспечения АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist версия 1.0. Порядок работы с ПО АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist версия 1.0 описан в руководстве оператора.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по следующим каналам (см. табл. 7).

Таблица 7

Наименование ПЦР-смеси-FL	Канал для флуорофора		
	FAM	JOE	ROX
ПЦР-смесь-FL <i>Mg</i> /ML	область V домена гена 23S rRNA (дикий тип)	-	ген <i>gyrB</i>
ПЦР-смесь-FL <i>Mg</i> /FQ	-	область QRDR гена <i>ParC</i> (дикий тип)	ДНК ВКО (искусственная нуклеотидная последовательность)

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, а также с использованием коэффициентов F, K, d Lg(C), которые рассчитываются автоматически ПО АмплиСенс® *M.genitalium*-ML/FQ-Resist версия 1.0.

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

ПЦР-смесь-FL	Значение порогового цикла (Ct) и коэффициентов F, K, d Lg(C) по каналу для флуорофора			Результат
	FAM	JOE	ROX	
Вариант 1				
Mg/ML	отсутствует	не учитывается	отсутствует	ДНК <i>M.genitalium</i> НЕ обнаружена
Mg/FQ	не учитывается	отсутствует	определено меньше граничного	
Вариант 2				
Mg/ML	определено или отсутствует	не учитывается	определено или отсутствует*	Низкая концентрация ДНК <i>M.genitalium</i>. Невозможно определить присутствие мутаций
Mg/FQ	не учитывается	определено или отсутствует	определено или отсутствует	
Вариант 3				
Mg/ML	1. отсутствует	не учитывается	определено**	ОБНАРУЖЕНЫ мутации в участке, ответственном за резистентность к МАКРОЛИДАМ
	2. определено и выполняется хотя бы одно из условий: F < граничного значения и/или d Lg(C) > граничного значения и/или K < граничного значения			
Mg/FQ	не учитывается	определено или отсутствует	определено или отсутствует	
Вариант 4				
Mg/ML	определено или отсутствует	не учитывается	определено**	ОБНАРУЖЕНЫ мутации в участке, ответственном за резистентность к ФТОРХИНОЛОНАМ
Mg/FQ	не учитывается	1. отсутствует 2. определено и выполняется хотя бы одно из условий: F < граничного значения и/или d Lg(C) > граничного значения и/или K < граничного значения	определено или отсутствует	
Вариант 5				
Mg/ML	определено и выполняются условия: F ≥ граничного значения и d Lg(C) ≤ граничного значения и K ≥ граничного значения	не учитывается	определено**	НЕ ОБНАРУЖЕНО мутаций в участках, ответственных за резистентность к МАКРОЛИДАМ и ФТОРХИНОЛОНАМ.
Mg/FQ	не учитывается	определено и выполняются условия: F ≥ граничного значения и d Lg(C) ≤ граничного значения и K ≥ граничного значения	определено или отсутствует	

Вариант 6				
Mg/ML	отсутствует	не учитывается	отсутствует	Невалидный***
Mg/FQ	не учитывается	отсутствует	отсутствует или определено больше граничного	

* Концентрация *M.genitalium* < 1x10³ ГЭ/мл.

** Концентрация *M.genitalium* ≥ 1x10³ ГЭ/мл.

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

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапа амплификации ДНК в соответствии с табл. 9 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 9

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Наименование ПЦР-смеси-FL	Значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора		
		FAM	JOE	ROX
K- (отрицательный контроль ПЦР)	Mg/ML	отсутствует	не учитывается	отсутствует
	Mg/FQ	не учитывается	отсутствует	отсутствует
K1 (ДНК-калибратор)	Mg/ML	<u>определено</u> меньше граничного	не учитывается	<u>определено</u> меньше граничного
	Mg/FQ	не учитывается	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
K2 (ДНК-калибратор)	Mg/ML	<u>определено</u>	не учитывается	<u>определено</u>
	Mg/FQ	не учитывается	<u>определено</u>	<u>определено</u>

Возможные ошибки:

1. Для отрицательного контроля ПЦР (К–):
 - а) по каналам для флуорофоров FAM и/или ROX на ПЦР-смеси-FL Mg/ML или по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX на ПЦР-смеси-FL Mg/FQ определено значение порогового цикла ($Ct-1$). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
 - б) по каналам для флуорофоров FAM на ПЦР-смеси-FL Mg/ML или по каналу для флуорофоров JOE на ПЦР-смеси-FL Mg/FQ определено значение порогового цикла ($Ct-2$). Необходимо проверить правильность установки пробирок или обозначения контрольного образца в блоке амплификатора. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
2. Для ДНК-калибраторов K1, K2 Mg/ML отсутствует значение порогового цикла ($Ct-1$ и/или $Ct-2$) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 9). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
3. Для ДНК-калибраторов K1, K2 Mg/FQ отсутствует значение порогового цикла ($Ct-1$ и/или $Ct-2$) по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. табл. 9). Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов.
4. Коэффициент корреляции R^2 при построении калибровочной прямой менее 0,9. Необходимо проверить правильность заданных концентраций ДНК-калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов. При повторном получении неудовлетворительного результата необходимо повторить

амплификацию и детекцию для всех образцов.

5. Показатель эффективности E , при построении калибровочной прямой, менее 70 % или более 120 %. 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 амплификацию и детекцию для всех образцов.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 15 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма 1. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-буфера-В и полимеразы (TaqF). ПЦР-буфер-В и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL Mg/ML и ПЦР-смесь-FL Mg/FQ хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru⁶.

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

Заведующий НПЛ ОмДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ
«Поликлиника №1»
Управления делами Президента
Российской Федерации



Е.В. Ржевская

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Температурный диапазон



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления