



УТВЕРЖДАЮ  
Директор по качеству  
и регистрации продукции ООО «ТестГен»  
Л.М. Халилова  
«30» августа 2024 г.



## **ИНСТРУКЦИЯ** **по применению**

**Набор реагентов для качественного выявления ДНК  
*Mycoplasma pneumoniae* в клиническом материале и  
определения мутаций, ассоциированных с  
устойчивостью к макролидам, методом  
мультиплексной ПЦР-РВ  
«MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST»**

ТУ 20.59.52-072-97638376-2024

## Содержание

Список сокращений .....	3
Введение.....	4
1. Назначение.....	7
2. Принцип метода .....	9
3. Состав набора реагентов .....	11
4. Характеристики набора реагентов .....	13
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.....	26
6. Меры предосторожности при работе с набором реагентов .....	28
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов.....	31
8. Анализируемые образцы .....	33
9. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК .....	36
10. Подготовка компонентов набора для исследования.....	37
11. Проведение анализа .....	38
12. Регистрация и интерпретация результатов.....	42
13. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов.....	46
14. Утилизация .....	47
15. Гарантийные обязательства, контакты .....	48
<b>Приложение А.....</b>	<b>49</b>

## Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	внутренний контрольный образец
ГЭ	геном-эквивалент
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
КОС	контрольный образец специфичности
КОЧ	контрольный образец для определения чувствительности
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме «реального времени»

## Введение

**Целевыми анализаторами**, выявляемыми при помощи набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST», являются специфичный участок геномной ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и мутации гена 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae* – A2063G, A2063T, A2064G, A2063C, ассоциированные с устойчивостью к макролидам.

### Научная обоснованность

*Mycoplasma pneumoniae* является одним из наиболее часто встречаемых атипичных возбудителей внебольничной пневмонии.

Диагностика микоплазменной пневмонии только на основании клинических или рентгенологических данных невозможна, поскольку не имеет патогномических черт. Основная роль в подтверждении микоплазменной этиологии отводится лабораторной диагностике. Культуральный метод является трудоемким и дорогостоящим, так как *M. pneumoniae* относится к медленно растущим бактериям, очень требовательным к условиям культивирования. Серологическая диагностика по определению IgM и IgG в парных сыворотках, собранных с интервалом 2–3 недели, является слишком длительным методом в стационарной практике. Наибольшее значение в верификации микоплазменной инфекции в настоящее время имеет полимеразная цепная реакция (ПЦР), а использование этой технологии в режиме реального времени и мультиплексном формате позволяет одновременно выявить несколько этиологически значимых патогенов и назначить этиотропную терапию, а также скорректировать результаты эмпирической терапии<sup>1</sup>.

Быстрая диагностика и правильная терапия при пневмонии очень важна, поскольку несвоевременное или неправильное лечение может закончиться развитием пневмосклероза и деформацией бронхов в зоне поражения<sup>2</sup>.

Макролиды являются препаратами с высокой активностью в отношении атипичных возбудителей и включены в схемы терапии первой линии для лечения внебольничной пневмонии

---

<sup>1</sup> Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний. Методические рекомендации. ФЦГиЭ Роспотребнадзора. 2014 г. С. 20-23.

<sup>2</sup> Пневмония (внебольничная) (возрастная категория – дети). Клинические рекомендации РФ. 2022 г.

микоплазменной этиологии. Начиная с 2000 г., отмечается распространение вторичной резистентности к макролидам у *M. pneumoniae*. В настоящее время хорошо описаны механизмы устойчивости к макролидам у клинических изолятов *M. pneumoniae*. Одним из ведущих механизмов является наличие мутаций в генах пептидилтрансферазной петли V домена 23S рРНК *M. pneumoniae*, которые приводят к снижению аффинности препаратов<sup>3</sup>.

Было показано, что мутации в локусах 2063 и 2064 связаны с высоким уровнем резистентности, в свою очередь мутация в локусе 2617 связана с низким уровнем резистентности к антибиотикам группы макролидов. Исследования показали, что наиболее распространенной мутацией является A2063G, на долю которой приходится 93,7% всех случаев, при этом совместно с мутациями A2063G, A2063T и A2064G достигается значение 99%. Крайне редко также встречаются замены A2063C, A2064C и C2617G<sup>4</sup>.

**Материалом для проведения исследования** служат пробы ДНК, выделенные из бронхоальвеолярной лаважной жидкости, промывных вод бронхов, мазков со слизистой носоглотки и слизистой задней стенки ротоглотки, мокроты.

**Область применения набора реагентов** – клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний и выявление мутаций в гене, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к определенным группам препаратов.

### **Показания и противопоказания к применению**

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

Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования клинического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекционного заболевания дыхательных путей (в т.ч. пневмонии).

---

<sup>3</sup> Иванова О.В., Эйдельштейн И.А., Ромашов О.И., Козлов Р.С. Оценка влияния мутаций в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*, обуславливающих устойчивость к макролидам, на тяжесть течения внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста, находившихся на лечении в Смоленском военном госпитале // КМАХ. 2020. Т.22. №4. С. 306-312.

<sup>4</sup> Liu L, Xiang C, Zhang Y, He L, Meng F, Gong J, Liu J, Zhao F. A Novel Detection Procedure for Mutations in the 23S rRNA Gene of Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* with Two Non-Overlapping Probes Amplification Assay // Microorganisms. 2024. Ch.12. N.1. P.62.

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

**Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия:** популяционных, демографических аспектов применения набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» не выявлено.

**Стерильность:** изделие нестерильно.

## 1. Назначение

**Назначение:** набор реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях для качественного выявления специфичного участка геномной ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и определения мутаций гена 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*, ассоциированных с устойчивостью к макролидам, методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробе ДНК, выделенной из клинического материала (бронхоальвеолярная лаважная жидкость, промывные воды бронхов, мазки со слизистой носоглотки и слизистой задней стенки ротоглотки, мокрота), полученного от лиц с подозрением на наличие инфекции, вызванной данным возбудителем, для диагностики инфекционного заболевания дыхательных путей (в т.ч. пневмонии) и определении схемы терапии заболевания.

**Функциональное назначение.** Полученные результаты могут использоваться при диагностике инфекционного заболевания дыхательных путей (в т.ч. пневмонии) и определении схемы терапии заболевания.

Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации в сочетании с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

### **Потенциальные потребители медицинского изделия**

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клиничко-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский технолог, медицинский лабораторный техник.

### **Преимущества и ограничения медицинского изделия ИВД в отношении предполагаемого использования**

Диагностика микоплазменной пневмонии только на основании клинических или рентгенологических данных невозможна, поскольку не имеет патогномических черт. Основная роль в подтверждении микоплазменной этиологии отводится лабораторной диагностике. Культуральный метод является трудоемким и

дорогостоящим, так как *M. pneumoniae* относится к медленно растущим бактериям, очень требовательным к условиям культивирования. Серологическая диагностика по определению IgM и IgG в парных сыворотках, собранных с интервалом 2–3 недели, является слишком длительным методом в стационарной практике. Наибольшее значение в верификации микоплазменной инфекции в настоящее время имеет полимеразная цепная реакция (ПЦР), а использование этой технологии в режиме реального времени и мультиплексном формате позволяет одновременно выявить несколько этиологически значимых патогенов и назначить этиотропную терапию, а также скорректировать результаты эмпирической терапии<sup>5</sup>.

**Ограничения метода.** Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе выделения ДНК либо проведения реакции мультиплексной ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит.

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

Набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах исследования с использованием данного набора реагентов. В диагностических целях результаты должны использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тест-системами, применяемой терапией.

---

<sup>5</sup> Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний. Методические рекомендации. ФЦГиЭ Роспотребнадзора. 2014 г. С. 20-23.

## 2. Принцип метода

### Метод

Мультиплексная полимеразная цепная реакция с гибридационно-флуоресцентной детекцией в реальном времени.

### Тип анализируемого образца

Материалом для проведения исследования служат пробы ДНК, выделенные из клинического материала – бронхоальвеолярная лаважная жидкость, промывные воды бронхов, мазки со слизистой носоглотки и слизистой задней стенки ротоглотки, мокрота.

### Принцип определения

Качественное выявление ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и определение мутаций гена 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*, ассоциированных с устойчивостью к макролидам, методом мультиплексной аллель-специфической ПЦР в реальном времени в пробе ДНК, выделенной из клинического материала, включает в себя следующие этапы:

1. Подготовка ПЦР;
2. ПЦР-амплификация ДНК и гибридационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме реального времени;
3. Интерпретация результатов.

С пробами ДНК проводятся реакции амплификации участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров в реакционном буфере. В состав ПЦР-буфера входят все основные реагенты, включая термостабильную *Taq*-полимеразу с «горячим стартом», dNTP, урацил-ДНК-гликозидазу и оптимизированный буфер. Наличие фермента урацил-ДНК-гликозидаза препятствует получению ложноположительных результатов при контаминации продуктами амплификации, при этом фермент полностью инактивируется в процессе первого цикла денатурации ДНК и не препятствует амплификации продуктов текущей реакции. В составе праймер-микса присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и разрушаются *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушителем, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения

интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

Набор содержит реагенты для мультиплексного определения высокоспецифичного участка ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, мутаций A2063G, A2063T, A2064G и A2063C (без дифференциации) в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*, а также специфичного фрагмента ВКО (табл. 1).

Таблица 1. Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору		
FAM/ Green	ROX/ Orange	HEX/ Yellow
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Мутация A2063G / A2063T / A2064G / A2063C в гене 23S рРНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (без дифференциации)	ВКО

ВКО позволяет оценить качество и эффективность выделения ДНК и возможное наличие ингибиторов амплификации в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

**Время проведения реакции мультиплексной ПЦР** составляет 60–80 минут (без учета пробоподготовки), в зависимости от используемого амплификатора.

### 3. Состав набора реагентов

#### Форма комплектации

Набор реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» выпускается в одной форме комплектации – «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST».

#### Количество анализируемых проб

Каждый набор «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» рассчитан на проведение 96 реакций, что соответствует определению при одновременном исследовании 94 клинических образцов при одном запуске амплификатора или определению при единичной постановке 32 исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

#### Состав набора

Таблица 2. Состав набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST»

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ПЦР-буфер 5x	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2	Праймер-микс	Прозрачная жидкость сиреневого цвета	1 пробирка, 480 мкл
3	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
4	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 950 мкл
5	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки по 1 800 мкл

**ПЦР-буфер 5x** готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты, урацил-ДНК-гликозилазу и оптимизированный буфер.

**Праймер-микс** готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. Праймеры и зонд к специфичному участку геномной ДНК *Mycoplasma pneumoniae*. Детекция осуществляется по каналу FAM/Green.

2. Праймеры и зонды к фрагментам гена 23S рРНК ДНК *Mycoplasma pneumoniae* с мутациями А2063G, А2063Т, А2064G, А2063С (обнаруживают мутации, но не различают их). Детекция осуществляется по каналу ROX/Orange.

3. Праймеры и зонд к ВКО. Детекция осуществляется по каналу HEX/Yellow.

**Положительный контрольный образец (ПКО)** готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: специфичные фрагменты ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, фрагмент гена 23S рРНК ДНК *Mycoplasma pneumoniae* с мутацией А2063G и ВКО.

**Внутренний контрольный образец (ВКО)** готов к использованию и представляет собой плазмидную ДНК с синтетической вставкой специфичного фрагмента ДНК Bacteriophage MS2.

**Отрицательный контрольный образец (ОКО)** готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

## 4. Характеристики набора реагентов

### 4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3. Набор реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
<b>1. Технические характеристики</b>	
<b>1.1. Внешний вид</b>	
ПЦР-буфер 5х	Прозрачная бесцветная жидкость
Праймер-микс	Прозрачная жидкость сиреневого цвета
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
<b>1.2. Комплектность</b>	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-045-97638376-2021
<b>1.3. Маркировка</b>	В соответствии с п. 1.5 ТУ 21.20.23-045-97638376-2021
<b>1.4. Упаковка</b>	В соответствии с п. 1.6 ТУ 21.20.23-045-97638376-2021
<b>2. Функциональные характеристики</b>	
Прохождение реакции в пробирках с ПКО	По каналам FAM, ROX и HEX: $20 \geq Ct \leq 27$
Прохождение реакции в пробирках с ОКО	По каналам FAM и ROX Ct не указан или $> 38$ , по каналу HEX не указан или $Ct > 35$
Прохождение реакции в пробирках с ВКО	По каналам FAM и ROX Ct не указан или $> 38$ , по каналу HEX $Ct \leq 29$
Прохождение реакции в пробирках с СОП-КОС-МР	По каналам FAM и ROX Ct не указан или $> 38$ , по каналу HEX $Ct > 35$
Прохождение реакции в пробирках с СОП-КОС-23S рРНК	По каналу FAM: $Ct \leq 20$ , $\Delta Ct$ между каналами FAM и ROX $> 15$ , по каналу HEX Ct не указан или $> 35$
Прохождение реакции в пробирках с СОП-КОЧ-А2063G	По каналам FAM, ROX $Ct \leq 35$ , $\Delta Ct$ между каналами FAM и ROX $\leq 5$ , по каналу HEX Ct не указан или $> 35$
Прохождение реакции в пробирках с СОП-КОЧ-А2063Т	По каналам FAM, ROX $Ct \leq 35$ , $\Delta Ct$ между каналами FAM и ROX $\leq 5$ , по каналу HEX Ct не указан или $> 35$
Прохождение реакции в пробирках с СОП-КОЧ-А2064G	По каналам FAM, ROX $Ct \leq 35$ , $\Delta Ct$ между каналами FAM и ROX $\leq 5$ , по каналу HEX Ct не указан или $> 35$

Прохождение реакции в пробирках с СОП-КОЧ-А2063С	По каналам FAM, ROX Ct $\leq 35$ , $\Delta$ Ct между каналами FAM и ROX $\leq 5$ , по каналу HEX Ct не указан или $> 35$
--	--

В случае неисправности медицинского изделия, отклонений в его функционировании, которые могут влиять на безопасность, изменений аналитических характеристик изделия незамедлительно прекратить применение медицинского изделия и сообщить производителю (см. раздел 15 Инструкции).

## 4.2. Характеристики аналитической эффективности

### 4.2.1. Аналитическая чувствительность и аналитическая специфичность

Набор реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST»		
Аналитическая специфичность		
<p>Специфичен по отношению к <i>Mycoplasma pneumoniae</i> и мутациям A2063G, A2063T, A2064G, A2063C в гене 23S рРНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i>. Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце геномной ДНК человека, ДНК <i>Streptococcus spp.</i>, <i>Moraxella catarrhalis</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Staphylococcus saprophiticus</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Proteus mirabilis</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Mycobacteria tuberculosis</i>, <i>Neisseria flava</i>, <i>Neisseria sicca</i>, <i>Neisseria mucosa</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Legionella pneumophila</i>, <i>Shigella flexneri</i>, <i>Shigella sonnei</i>, <i>Salmonella enteritidis</i>, <i>Yersinia enterocolitica</i>, <i>Mycoplasma genitalium</i>, <i>Mycoplasma hominis</i>, <i>Ureaplasma parvum</i>, <i>Chlamydia trachomatis</i>.</p>		
Аналитическая чувствительность <sup>6</sup>		
Вид клинического материала	Набор для выделения ДНК	Чувствительность
Пробы ДНК, выделенные из клинического материала – бронхоальвеолярный лаваж (или промывные воды бронхов), мазки со слизистой носоглотки и слизистой задней стенки ротоглотки, мокрота.	«НК-ЭКСТРА»	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> – 1 000 ГЭ/мл
		Мутации гена 23S рРНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> – 1 000 ГЭ/мл
Пробы ДНК, выделенные из клинического материала – мазки со слизистой носоглотки и слизистой задней стенки ротоглотки.	«НК-ЭКСТРА-SW»	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> – 1 000 ГЭ/мл
		Мутации гена 23S рРНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> – 1 000 ГЭ/мл

<sup>6</sup> Все значения чувствительности даны при выделении ДНК рекомендуемыми наборами реагентов (см. п. 8.2 Инструкции) из образца объемом 100 мкл и объеме элюата не более 50 мкл.

#### 4.2.2. Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости использовали стандартные образцы предприятия:

- **СОП-КОЧ-А2063G**, готов к использованию и представляет собой выявляемые набором реагентом целевой фрагмент молекулы ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и целевой фрагмент гена 23S рРНК молекулы ДНК *Mycoplasma pneumoniae* с мутацией А2063G в консерванте с концентрацией 1000 копий/мл каждая.

- **СОП-КОЧ-А2063Т**, готов к использованию и представляет собой выявляемые набором реагентом целевой фрагмент молекулы ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и целевой фрагмент гена 23S рРНК молекулы ДНК *Mycoplasma pneumoniae* с мутацией А2063Т в консерванте с концентрацией 1000 копий/мл каждая.

- **СОП-КОЧ-А2064G**, готов к использованию и представляет собой выявляемые набором реагентом целевой фрагмент молекулы ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и целевой фрагмент гена 23S рРНК молекулы ДНК *Mycoplasma pneumoniae* с мутацией А2064G в консерванте с концентрацией 1000 копий/мл каждая.

- **СОП-КОЧ-А2063С**, готов к использованию и представляет собой выявляемые набором реагентом целевой фрагмент молекулы ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и целевой фрагмент гена 23S рРНК молекулы ДНК *Mycoplasma pneumoniae* с мутацией А2063С в консерванте с концентрацией 1000 копий/мл каждая.

- **СОП-КОС-МР**, готов к использованию и представляет собой раствор геномной ДНК человека с концентрацией  $10^6$  копий/мл.

- **СОП-КОС-23S рРНК**, готов к использованию и представляет собой выявляемые набором реагентом целевой фрагмент молекулы ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и фрагмент гена 23S рРНК молекулы ДНК *Mycoplasma pneumoniae* без мутаций, обуславливающих устойчивость к макролидам, в концентрации  $10^7$  копий/мл.

Контрольные образцы СОП-КОЧ-А2063G, СОП-КОЧ-А2063Т, СОП-КОЧ-А2064G, СОП-КОЧ-А2063С, СОП-КОС-МР, СОП-КОС-23S рРНК были исследованы в количестве 10 повторов набором реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST».

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» составляет не более 3%.

#### **4.2.3. Прецизионность в условиях воспроизводимости**

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчету прецизионности в условиях повторяемости, однако для тестирования используют различные наборы из партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

Процедуру выделения ДНК из контрольных образцов проводили с использованием следующих, рекомендованных в инструкции по применению, наборов реагентов для выделения ДНК:

При проведении исследований прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутривыставочная, межвыставочная и межсерийная воспроизводимость. Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» составляет не более 5%.

**4.2.4. Метрологическая прослеживаемость** калибровки и приписанное значение калибраторов конечного пользователя – ПКО, входящего в состав набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST», и рабочих калибраторов СОП-КОЧ-A2063G, СОП-КОЧ-A2063Т, СОП-КОЧ-A2064G, СОП-КОЧ-A2063С, СОП-КОС-МР, СОП-КОС-23S рРНК в соответствии с ГОСТ Р ИСО 17511— 2022.

Иерархия калибровки по отношению к ДНК *Mycoplasma pneumoniae* и ДНК *Mycoplasma pneumoniae* с наличием мутации (A2063G/A2063Т/A2064G/A2063С) в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae* проведена в соответствии с п. 5.7 ГОСТ Р ИСО 17511— 2022 для измерений с метрологической прослеживаемостью только до внутренних произвольно определенных СО производителя.

В качестве арбитражного СО, по отношению к ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, использовали выделенную из биологического материала человека ДНК исследуемых аналитов:

№ п/п	Наименование образца	Уровень ДНК, копий/мл	Уровень ДНК, log10 копий/мл	Суммарная неопределенность присвоения значения СО
1	СО- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (СО-МР)	1576812	6,20	$u_{m.3}(CO - MP) = 0,05$
2	СО- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2063G (СО-МР-A2063G)	2577170	6,41	$u_{m.3}(CO - MP - A2063G) = 0,03$
3	СО- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2063T (СО-МР-A2063T)	119201	5,08	$u_{m.3}(CO - MP - A2063T) = 0,03$
4	СО- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2064G (СО-МР-A2064G)	1075528	6,03	$u_{m.3}(CO - MP - A2064G) = 0,04$
5	СО- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2063C (СО-МР-A2063C)	394770	5,60	$u_{m.3}(CO - MP - A2063C) = 0,03$

Общая иерархия калибровки с указанием неопределенности измерений на каждом этапе следующая:

Аналит	Тип образца	Образец	Неопределенность измерений	Суммарная стандартная неопределенность	Расширенная суммарная неопределенность
ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Арбитражный стандартный образец	СО- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (СО-МР)	$u_{m.3} = 0,05$	$u(y) = 0,30$	$U(y) = 0,60$
	Рабочий калибратор	СОП-КОС-23S рРНК	$u_{p.4} = 0,06$		
	Калибратор МИ IVD конечного пользователя	ПКО	$u_{p.5} = 0,05$ $u_{cal} = 0,09$		
ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2063G	Арбитражный стандартный образец	СО- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2063G (СО-МР-A2063G)	$u_{m.3} = 0,03$	$u(y) = 0,39$	$U(y) = 0,78$
	Рабочий калибратор	СОП-КОЧ-A2063G	$u_{p.4} = 0,06$		
	Калибратор МИ IVD	ПКО	$u_{p.5} = 0,07$ $u_{cal} = 0,10$		

	конечного пользователя				
ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2063T	Арбитражный стандартный образец	СО- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2063T (СО-МР-А2063Т)	$u_{m.3} = 0,03$	$u(y) = 0,31$	$U(y) = 0,62$
	Рабочий калибратор	СОП-КОЧ-А2063Т	$u_{p.4} = 0,11$		
	Калибратор МИ IVD конечного пользователя	ПКО	$u_{p.5} = 0,03$ $u_{cal} = 0,12$		
ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2064G	Арбитражный стандартный образец	СО- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2064G (СО-МР-А2064G)	$u_{m.3} = 0,04$	$u(y) = 0,37$	$U(y) = 0,74$
	Рабочий калибратор	СОП-КОЧ-А2064G	$u_{p.4} = 0,05$		
	Калибратор МИ IVD конечного пользователя	ПКО	$u_{p.5} = 0,10$ $u_{cal} = 0,12$		
ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2063C	Арбитражный стандартный образец	СО- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -A2063C (СО-МР-А2063С)	$u_{m.3} = 0,03$	$u(y) = 0,34$	$U(y) = 0,68$
	Рабочий калибратор	СОП-КОЧ-А2063С	$u_{p.4} = 0,05$		
	Калибратор МИ IVD конечного пользователя	ПКО	$u_{p.5} = 0,08$ $u_{cal} = 0,10$		

Приписанная концентрация калибратора конечного пользователя **ПКО** составляет  $10^5 - 10^6$  копий/мл, рабочих калибраторов **СОП-КОЧ-А2063Т, СОП-КОЧ-А2064G, СОП-КОЧ-**

**A2063C, СОП-КОЧ-A2063G** составляет 1000 копий/мл, **СОП-КОС-23S рРНК**  $10^7$  копий/мл.

В соответствии с п. 4.7.1 с) ГОСТ Р ИСО 17511— 2022 суммарная стандартная неопределенность измерения значения, присвоенного калибратором МИ IVD конечного пользователя (ПКО)  $u_{cal}$  не превышает допустимую долю  $U_{max}(y)$  спецификации для МИ IVD с учетом коэффициента охвата  $k$  ( $k=2$ , для уровня достоверности приблизительно 95 %):

Оценка суммарной стандартной неопределенности измерений набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» по отношению к ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Клинический материал
$u_{cal} = 0,60 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	Мокрота
$u_{cal} = 0,78 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	Мазок со слизистой носоглотки
$u_{cal} = 0,62 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	Мазок со слизистой задней стенки ротоглотки
$u_{cal} = 0,74 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	Мокрота
$u_{cal} = 0,68 \leq \frac{1}{2} U_{max}(y) = 1$	БАЛ

И в соответствии с п. 4.1 с) ГОСТ Р ИСО 17511— 2022 оцененная суммарная расширенная неопределенность измерений  $U(y)$  не превышает максимально допустимую неопределенность измерения  $U_{max}(y)$ :

Оценка суммарной расширенной неопределенности измерений набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» по отношению к ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Клинический материал
$U(y)=0,60 \leq U_{max}(y)=2$	Мокрота
$U(y)=0,78 \leq U_{max}(y)=2$	Мазок со слизистой носоглотки
$U(y)=0,62 \leq U_{max}(y)=2$	Мазок со слизистой задней стенки ротоглотки
$U(y)=0,74 \leq U_{max}(y)=2$	Мокрота
$U(y)=0,68 \leq U_{max}(y)=2$	БАЛ

**Иерархия калибровки СОП-КОС-МР** проведена с первичной РМИзм, определяющей измеряемую величину (п. 5.3 ГОСТ Р ИСО 17511— 2022).

Общая иерархия калибровки с указанием неопределенности измерений на каждом этапе следующая

Аналит	Образец	Тип образца	Неопределенность измерений	Суммарная стандартная неопределенность	Расширенная суммарная неопределенность
геномная ДНК человека, выделенная из клеточной линии U937	Вторичный СО - геномная ДНК человека, выделенная из клеточной линии U937 (производства ООО “СибЭнзайм”, Россия)	Вторичный СО	$u_{m,3} = 0,78$	$u(y) = 0,78$	$U(y) = 1,56$
	СОП-КОС-МР	Рабочий калибратор	$u_{p,4} = 0,1$		

Приписанная концентрация рабочего калибратора СОП-КОС-МР составляет  $10^6$  копий/мкл.

#### **4.2.5. Интерферирующие вещества и ограничения по использованию анализируемого материала**

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST», и, предположительно, влиять на способность набора реагентов выдавать достоверные результаты.

Интерферирующие вещества могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

- 1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);
- 2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов – в данном случае, загрязнение клинического образца гемоглобином

крови может ингибировать ПЦР при недостаточной очистке при проведении процедуры выделения ДНК;

Исследованные концентрации интерферирующих веществ приведены в таблице 4.

Таблица 4. Интерферирующие вещества

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
<b>Эндогенные интерферирующие вещества</b>	
Гемоглобин	100 мг/мл
Слизь (муцин)	3%
<b>Экзогенные интерферирующие вещества</b>	
Препараты лечебно-профилактического назначения	
Хлоргексидин	1 мг/мл
Мирамистин	100 мкг/мл
Ксилометазолин	500 мкг/мл

#### **Ограничения по использованию анализируемого материала:**

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);

- не допускается использование образцов, загрязненных посторонним биологическим материалом.

### **4.3. Характеристики клинической эффективности**

Для проведения клинических испытаний было использовано 196 образцов клинического материала (бронхоальвеолярная лаважная жидкость - 30, промывные воды бронхов - 32, мазки со слизистой носоглотки - 48, мазки со слизистой задней стенки ротоглотки - 47, мокрота - 39), от пациентов с подозрением на наличие инфекции, вызванной бактериальным возбудителем *Mycoplasma pneumoniae*, которые были получены из банка остаточных аликвот, сформированного в процессе рутинной лечебно-диагностической практики.

Такое количество образцов было набрано в соответствии с рекомендациями ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом рекомендаций Международного руководства CLSI EP09-A3.

Каждый исследуемый клинический образец был протестирован

в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» и полученные данные сравнивались с результатами, полученными с помощью зарегистрированного медицинского изделия:

- Набор реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Mycoplasma pneumoniae*) по ТУ 9398-507-23548172-2015, производства АО "Вектор-Бест" (ПУ № РЗН 2016/3960 от 14.03.2024 г.).

Для установления наличия мутаций в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae* был использован метод секвенирования по Сенгеру на генетическом анализаторе (секвенаторе) Applied Biosystems 3500 (Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2010/07007 от 28.03.2022 г.).

Свидетельством правильности работы исследуемого медицинского изделия было совпадение результатов.

Для проведения ПЦР-исследования набором реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» использовали амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- CFX96 (BioRad, США, ПУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016),
- «ДТпрайм» (ООО "НПО ДНК-Технология", Россия, ПУ № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011),
- Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия, ПУ № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010),
- QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Сингапур, ПУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019),
- FLUORITE (Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd., Китай, ПУ № РЗН 2022/16415 от 04.04.2024),
- LOCUS Intero (Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd., Китай, ПУ № РЗН 2024/22132 от 04.03.2024).

Воспроизводимость результатов для всех использованных амплификаторов 100%.

Доверительные интервалы (ДИ) диагностических характеристик были рассчитаны по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper, C., & Pearson, E. (1934). The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*, 26(4), 404-413. doi:10.2307/2331986). Диагностические характеристики испытуемого набора были

рассчитаны с доверительной вероятностью 95 %.

Таблица 5 - Результаты изучения диагностических характеристик по образцам клинического материала по отношению к ДНК *Mycoplasma pneumoniae*

Вид исследуемого материала	Кол-во наблюдений с положительными пробами	Кол-во наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Бронхоальвеолярная лаважная жидкость	20	40	100% (95% ДИ:83,16%-100%)	100% (95% ДИ:91,19%-100%)
Промывные воды бронхов	24	40	100% (95% ДИ:85,75%-100%)	100% (95% ДИ:91,19%-100%)
Мазки со слизистой носоглотки	44	52	100% (95% ДИ:91,96%-100%)	100% (95% ДИ:93,15%-100%)
Мазки со слизистой задней стенки ротоглотки	46	48	100% (95% ДИ:92,29%-100%)	100% (95% ДИ:92,60%-100%)
Мокрота	34	44	100% (95% ДИ:89,72%-100%)	100% (95% ДИ:91,96%-100%)

Таблица 6 - Результаты изучения диагностических характеристик по отношению к мутациям в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae* (определяет мутации A2063G, A2063T, A2064G, A2063C, но не различает их).

Аналит	Мутация	Кол-во наблюдений с положительными пробами	Кол-во наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Мутации в гене 23S рРНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ( <u>определяет мутации A2063G, A2063T, A2064G, A2063C, но не различает их</u> )	A2063G	62	106	100% (95% ДИ:83,16%-100%)	100% (95% ДИ:97,24%-100%)
	A2063T	8	160		
	A2064G	24	144		
	A2063C	12	156		

## **5. Контроль качества**

### **5.1. Внутренний контроль качества**

#### **5.1.1. Отрицательный и положительный контрольные образцы**

Каждая постановка ПЦР должна включать отрицательный контрольный образец (ОКО) и положительный контрольный образец (ПКО). Результаты для контрольных образцов ПКО и ОКО должны соответствовать заданным критериям, указанным в разделе «13. Регистрация и интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа процедуры выделения ДНК, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. Образец ОКО проходит процедуру выделения ДНК ОКО в объеме 100 мкл с добавлением 10 мкл ВКО.

В случае если для ОКО получены результаты несоответствующие указанным в таблице 7 раздела «13. Регистрация и интерпретация результатов», результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

В качестве положительного контроля используется ПКО, входящий в состав набора. При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 7 раздела «13. Регистрация и интерпретация результатов», результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторная постановка амплификации всех исследуемых образцов и контролей. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 7 раздела «13. Регистрация и интерпретация результатов», необходимо заменить реагенты.

#### **5.1.2. Контроль ингибирования**

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО, который добавляется в каждый исследуемый образец на этапе выделения ДНК. Результаты тестирования ВКО должны соответствовать значениям указанным в таблице 8 раздела «12. Регистрация и интерпретация результатов» для отрицательных исследуемых образцов. Если в исследуемых

образцах, отрицательных на наличие исследуемых аналитов, не обнаружена ДНК ВКО (канал детекции HEX), то результаты исследования данных образцов считаются невалидными, требуется повторить повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

### **5.1.3. 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.

### **5.2. 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. pneumoniae*.

## **6. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов**

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;

2. Перекрестная контаминация образцов;

3. Загрязнение материалов ингибирующими веществами;

4. Контаминация реакционных смесей с образцами исследуемой ДНК содержащим из пробирки ПКО или продуктами ПЦР;

5. Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированным персоналом;

6. Использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия «Набор реагентов для качественного выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* в клиническом материале и определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к макролидам, методом мультиплексной ПЦР-РВ «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST»» является допустимым, польза от его применения превышает риск.

## **7. Меры предосторожности при работе с набором реагентов**

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б – в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST», относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST», не токсичны, поскольку готовятся путем смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность, проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

– удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

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

– применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

– допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским или биологическим образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА III–IV групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);

– не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию;

– набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

– не использовать набор по истечении срока годности;

– избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой.

При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

## **8. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов**

Работа с набором реагентов для мультиплексной ПЦР осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакций) (МУ 1.3.2569-09).

### **Оборудование для проведения мультиплексной ПЦР:**

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, Боксы микробиологической безопасности БМБ-II- "Ламинар-С" по ТУ 32.50.50-010-51495026-2020, производства ЗАО "Ламинарные системы", РУ № ФСР 2012/13259 от 29.07.2021 или Бокс для стерильных работ DNA/RNA UV-Cleaner Box UVC/T-M-AR, Biosan, Латвия, РУ № РЗН 2023/19369 от 18.01.2023);

2. Вортекс (например, Высокоскоростная мини-центрифуга Microspin 12, BIOSAN SIA, Латвия, РУ № ФСЗ 2011/10116 от 11.07.2011 или центрифуга-встряхиватель CM-70M, производства SIA "ELMI", Латвия, РУ № РЗН 2016/4616 от 31.05.2023);

3. Дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 2–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл (например, Eppendorf Research Plus, Германия, РУ № ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011 или «Biohit», Финляндия, РУ № ФСЗ 2012/12201 от 18.05.2012);

4. Холодильник от 2 °С до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С (например, Холодильник комбинированный лабораторный ХЛ-250 "POZIS", ХЛ-250-1 "POZIS" по ТУ 9452-203-07503307-2012, производства АО "ПОЗИС", РУ № РЗН 2016/4043 от 03.06.2024);

5. Амплификатор<sup>7</sup> с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange:

- CFX96 (BioRad, США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016),
- «ДТпрайм» (ООО "НПО ДНК-Технология", Россия, РУ № ФСР 2011/10229 от 24.03.2025),

---

<sup>7</sup> Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

- Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010),

- QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Сингапур, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019),

- FLUORITE (Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd., Китай, РУ № РЗН 2022/16415 от 04.04.2024),

- LOCUS Intero (Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd., Китай, РУ № РЗН 2024/22132 от 04.03.2024).

**Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:**

**ВНИМАНИЕ!** При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл (например, «Ахуген», США).

2. Одноразовые пробирки Эппендорф на 1,5 мл.

3. Планшеты для ПЦР без «юбки» с оптически прозрачной пленкой (например, «Ахуген», США) или тонкостенные одноразовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (единичные или в стрипах):

- с оптически прозрачной крышкой для амплификатора планшетного типа (случае использования приборов FLUORITE и LOCUS Intero – плоская или выпуклая крышка, для остальных приборов – плоская);

- с оптически прозрачными стенками в случае использования амплификатора роторного типа.

4. Халат и одноразовые перчатки без талька.

5. Емкость с дезинфицирующим раствором.

6. Штативы для пробирок объемом 1,5-2 мл.

7. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл.

8. Набор для выделения ДНК из клинического материала.

В качестве реагентов для выделения ДНК рекомендовано использовать:

- Набор реагентов для выделения ДНК/РНК из клинического материала "НК-Экстра" по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, производства ООО «ТестГен», Россия, РУ № РЗН 2021/15428 от 05.06.2023 г

- Набор реагентов для выделения ДНК вирусов, бактерий и грибов и РНК вирусов из клинического материала человека на основе

метода обратимого связывания нуклеиновых кислот с поверхностью магнитных частиц с одной промывкой "НК-Экстра-SW" по ТУ 21.20.23-040-97638376-2021, производства ООО «ТестГен», Россия, РУ № РЗН 2023/21482 от 12.04.2024 г.).

9. Реагент для предобработки клинических образцов вязкой (слизистой) консистенции, в т.ч. мокроты (например, Реагент для предобработки слизистого материала «МУКОЛИЗИН» по ТУ 9398-159-01897593-2011, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, РУ № ФСР 2011/12082 от 13.03.2019).

## **9. Анализируемые образцы**

### **Тип анализируемого образца**

Материалом для проведения исследования служат пробы ДНК, выделенные из клинического материала – бронхоальвеолярная лаважная жидкость, промывные воды бронхов, мазки со слизистой носоглотки и слизистой задней стенки ротоглотки, мокрота.

### **Процедура получения клинического материала**

**ВНИМАНИЕ!** Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва, 2021).

Забор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами III- IV групп патогенности.

### **Забор материала на исследование<sup>8</sup>**

#### **Мазок со слизистой оболочки носоглотки**

Рабочую часть вельюр-тампона ввести легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней раковины. Затем вельюр-тампон слегка опустить вниз, ввести в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, сделать вращательное движение и удалить вдоль наружной стенки носа.

---

<sup>8</sup> Взятие, транспортировка, хранение биологического материала для ПЦР-диагностики / Э.А. Домонова, М.Г. Творогова, А.Т. Подколзин и др. // Методические рекомендации, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, 2021 г.

Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3–4 см для детей и 5–6 см для взрослых).

Перенести велюр-тампон в пробирку с транспортной средой.

Рабочую часть велюр-тампона, содержащую исследуемый материал, обломить и оставить в пробирке с транспортной средой.

Пробирку плотно закрыть крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки. В случае невозможности обламывания, погрузить рабочую часть велюр-тампона в транспортную среду и, прижав ее к внутренней стороне пробирки, вращать 5–10 с, после чего аппликатор удалить, пробирку плотно закрыть. Недопустимо использование ножниц для обрезания рабочей части велюр-тампона.

### **Мазок со слизистой оболочки ротоглотки**

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

**ВНИМАНИЕ!** При взятии мазков рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого сначала берут мазки разными зондами со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Хранение и транспортировка мазков из носоглотки и ротоглотки:

– при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 ч;

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
  - при температуре от -24 до -16 °С – в течение от 1 недели до 1 месяца;
  - при температуре не выше -68 °С – длительно.
- Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

### **Мокрота**

Мокроту в объеме не менее 1,0 мл (оптимально 3,0–5,0 мл) собрать в контейнер, плотно закрыть крышкой. Качественным материалом можно считать мокроту, имеющую слизистый или слизисто-гнойный характер. Если пациент не выделяет мокроту или выделяет ее только эпизодически и в скудном количестве, то накануне вечером и рано утром в день сбора биологического материала следует дать ему отхаркивающее средство или применить раздражающие ингаляции. При получении индуцированной мокроты в сопроводительном документе необходимо отметить, что материал получен после аэрозольных ингаляций.

### **Хранение и транспортировка:**

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 ч;
- при температуре от 2 до 8 °С – от 1 до 3 суток;
- при температуре от -24 до -16 °С – от 1 недели до 12 месяцев;
- при температуре не выше -68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

### **Бронхоальвеолярная лаважная жидкость, промывные воды бронхов**

Бронхоальвеолярную лаважную жидкость или промывные воды бронхов в объеме от 5,0 до 50,0 мл собрать в пробирку или контейнер при проведении бронхоскопии. Пробирку или контейнер плотно закрыть крышкой. Для контроля контаминации исследуемыми микроорганизмами или их НК рекомендуется провести предварительное взятие смывов с бронхоскопов, подготовленных для проведения процедуры бронхоскопии. С этой целью промыть канал и шланг аппарата 1,0 мл 0,9 % раствора натрия

хлорида. Полученный смыв перенести в пробирку для последующего тестирования. Пробирку плотно закрыть крышкой.

Хранение и транспортировка:

- при температуре от 2 до 8 °С – от 1 до 3 суток;
- при температуре от -24 до -16 °С – от 1 недели до 12 месяцев;
- при температуре не выше -68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание–оттаивание материала.

Утилизация клинического материала (класс В), как чрезвычайно эпидемиологически опасных отходов, осуществляется в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21.

## **10. Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК**

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок на 1,5 мл, наконечников с фильтрами и других материалов в соответствии с документами, перечисленными в пункте 6. «Меры предосторожности при работе с набором реагентов» данной инструкции.

### **Мазки со слизистой носоглотки и слизистой задней стенки ротоглотки**

Содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 секунд при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.

### **Мокрота**

Вязкая по консистенции мокрота подлежит обработке с целью снижения вязкости. Работа выполняется по инструкции к реагенту для предобработки клинических образцов вязкой (слизистой) консистенции (например, «МУКОЛИЗИН» по ТУ 9398-159-01897593-2011, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), либо по инструкции к набору для выделения ДНК «НК-ЭКСТРА». Подготовленную мокроту используют для экстракции ДНК. При необходимости повторного проведения анализа остаток мокроты замораживают.

## **Бронхоальвеолярная лаважная жидкость, промывные воды бронхов**

Образец перемешивают переворачиванием в исходной емкости. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл образца и переносят в пробирку объемом 1,5 мл для проведения центрифугирования при 10 тыс. об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирают, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Полученную суспензию (100 мкл) используют для экстракции ДНК. При необходимости повторного проведения анализа оставшийся материал замораживают.

### **11. Подготовка компонентов набора для исследования**

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

**ВНИМАНИЕ!** При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

Перед приготовлением реакционных смесей необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нем, с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20–30 минут. Перед проведением исследования необходимо разморозить компоненты набора при комнатной температуре.

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ПЦР-буфером 5х, праймер-миксом ОКО, ВКО и ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 сек., затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием. Компоненты набора должны быть разморожены и иметь комнатную температуру.

2. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,1–0,2 мл для ПЦР из расчета для каждого используемого мультиплекса: количество исследуемых образцов<sup>9</sup> + 1 ПКО + 1 ОКО.

## **12. Проведение анализа**

### **А. Этап экстракции ДНК**

Экстракция ДНК осуществляется в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения ДНК из клинического материала («НК-Экстра» по ТУ 21.20.23-013-97638376-2019, «НК-Экстра-SW» по ТУ 21.20.23-040-97638376-2021 или аналогичного).

К каждому исследуемому образцу в объеме 100 мкл перед выделением следует добавить 10 мкл ВКО из набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST».

Образец ОКО также проходит процедуру выделения ДНК в объеме 100 мкл с добавлением 10 мкл ВКО. Если инструкцией производителя набора реагентов для выделения ДНК предусмотрено использование большего объема образца, следует довести объем ОКО до требуемого физиологическим раствором или ТЕ-буфером.

### **Б. Подготовка ПЦР**

Производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскапывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации.

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

1. Подготовка ПЦР;
2. ПЦР-амплификация ДНК и гибридационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме реального времени;
3. Интерпретация результатов.

В таблице 5 приведена схема расположения ПЦР-пробирок при использовании набора .

---

<sup>9</sup> Для повышения точности рекомендуется анализировать каждый образец в двух повторах.

Таблица 5. Схема расположения пробирок для ПЦР

Образец 1	Образец n	ПКО	ОКО
○	○	○	○

**Общий объем реакции – 25 мкл.**

**ВНИМАНИЕ!** Запрещено изменять объем реакции. При изменении объема чувствительность метода резко снижается!

Для приготовления реакционной смеси на 1 реакцию необходимо:

1. ПЦР-буфер 5х – 5 мкл,
2. Праймер-микс – 5 мкл,
3. Образец (исследуемые образцы ДНК, ПКО, прошедшее процедуру выделения ОКО) – 15 мкл.

Готовить реакционные пробирки необходимо в следующем порядке:

1. Для каждого мультиплекса берется необходимое количество ПЦР-пробирок 0,2 мл для исследуемых образцов + 1 пробирка для ПКО + 1 пробирка для ОКО.

2. Внести в каждую пробирку по 5 мкл ПЦР-буфера 5х.

3. Внести в каждую пробирку по 5 мкл праймер-микса.

**Либо** (вместо 2 и 3 шага) внести по 10 мкл смеси праймер-микса и ПЦР-буфера<sup>10</sup>.

4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной ДНК. В пробирки для ПКО и ОКО ДНК не вносится.

5. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ПКО.

6. Внести в соответствующую пробирку 15 мкл ОКО, прошедшего процедуру выделения ДНК.

---

<sup>10</sup> Рекомендуется сначала приготовить смесь праймер-микса и ПЦР-буфера 5х в отдельной пробирке на 1,5–2,0 мл из расчета:  $(n+3) \times 5$  мкл ПЦР-буфера 5х и  $(n+3) \times 5$  мкл праймер-микса, где n – количество образцов, +3 реакции – для контрольных образцов (1 ПКО и 1 ОКО) и запаса. Смесь перемешать на вортексе, осадить капли коротким центрифугированием и использовать для приготовления реакционной смеси.

7. Закрывать пробирки, промаркировать (вне зон контакта пробирок с амплификатором и зон считывания флуоресцентного сигнала).

8. Перемешать раскапанные смеси на вортексе. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1–3 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

## **В. ПЦР-амплификация ДНК и гибридационно-флуоресцентная детекция продуктов амплификации в режиме реального времени**

Производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации.

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в реальном времени. Рекомендуется устанавливать пробирки симметрично к центру и ближе к середине термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой.

**ВНИМАНИЕ!** ПЦР-пробирки могут деформироваться от неравномерного давления в амплификаторах с опускающейся прижимной крышкой. В термоблок с 96 лунками должно быть установлено не менее 16 сбалансированных по расположению пробирок. Если недостаточно пробирок с реакционной смесью, установите дополнительно пустые пробирки в равной степени удаленности от краев термоблока.

**ВНИМАНИЕ!** ПЦР-пробирки для амплификаторов планшетного типа не должны иметь маркировок в зонах соприкосновения с деталями амплификатора. Для амплификатора роторного типа ПЦР-пробирки маркируются только на крышке.

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Протокол ПЦР для амплификаторов ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), CFX 96 (Bio-Rad, США), FLUORITE (АО «Вектор-Бест», Россия), LOCUS Intero (Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd., Китай) указан в таблице 6.

Таблица 6. Протокол ПЦР для «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST»

Стадия	Температура, °С	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	95	00:15	-	5
	64	00:20		
3	95	00:15	FAM/Green, ROX/Orange, HEX/Yellow	40
	64	00:20		

**ВНИМАНИЕ!** В случае использования амплификатора QuantStudio 5 необходимо произвести настройку оптических фильтров до запуска протокола амплификации (возможна регистрация сигнала VIC каналом ROX в случае  $\Delta Rn > 100\ 000$ , что может привести к получению ложноположительных результатов)! Для этого в закладке «Method» нажать кнопку «Action», после чего в сплывающем меню выбрать «Optical filter settings», где в разделе «PCR Filter» оставить только следующие комбинации фильтров: x1 – m1, x2 – m2, x4 – m4, x5 – m5, x6 – m6.

3. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.

4. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции FAM/Green, HEX/Yellow, ROX/Orange.

5. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала.

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

### 13. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят по завершении ПЦР автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

#### **Рекомендации по установке пороговой линии**

Для амплификаторов любых моделей пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала на уровне, соответствующем 5–10% от максимального уровня флуоресценции, полученного для положительного контрольного образца в последнем цикле амплификации. При необходимости следует произвести коррекцию базовой линии (baseline threshold) в программном обеспечении используемого амплификатора.

Интерпретация результатов выполняется по значениям  $C_t$  по каналам детекции FAM/Green, ROX/Orange, HEX/Yellow (см. табл. 1).

**ВНИМАНИЕ!** В случае использования амплификаторов Rotor-Gene Q и аналогичных, активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значения 5-10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal) для разных каналов детекции.

**ВНИМАНИЕ!** В случае использования амплификаторов CFX96 (BioRad) и QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) может возникнуть необходимость коррекции базовой линии (например, в случае, если графики имеют «наклонную» форму на ранних значениях  $C_t$  или вид «наклонных» прямых).

При использовании CFX96 (BioRad): необходимо выбрать один флуорофор, графики по которому требуется скорректировать, в разделе «Settings» выбрать «Baseline Threshold...», далее в диалоговом окне выделить все ячейки и указать  $C_t$  для диапазона, по которому следует провести коррекцию. Для диапазона следует использовать участок, начинающийся от флукуационных искривлений графиков флуоресценции в начале графиков («Baseline Begin») и заканчивающийся на 4 цикла раньше, чем самый ранний график флуоресценции («Baseline End»).

При использовании амплификатора QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific): также указать аналогичный диапазон в опции меню «Analysis settings» (разделы «Baseling Start Cycle» и «End Cycle»).

Сначала оценивают прохождение реакции и значения  $C_t$  в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

## **Интерпретация результатов исследования контрольных образцов**

Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены следующие результаты (табл. 7).

Таблица 7. Результаты исследования для отрицательного и положительного контрольных образцов

Контрольный образец	Флуорофор (канал детекции)		
	FAM/Green	HEX/Yellow	ROX/Orange
ОКО	Ct > 38 или отс.	Ct ≤ 35 или отс.	Ct > 38 или отс.
ПКО	Ct ≤ 27	Ct ≤ 27	Ct ≤ 27

Обозначения: «отс.» – значения Ct отсутствуют.

При получении для отрицательного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 7, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 7, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторная постановка амплификации всех исследуемых образцов и контролей. При повторном получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 7, необходимо заменить реагенты.

## **Интерпретация результатов исследуемых клинических образцов**

Принципы интерпретации результатов отражены в таблицах 8-9, обозначения: «не уч.» – значения Ct не учитываются; «отс.» – значения Ct отсутствуют.

Таблица 8. Принцип интерпретации результатов выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* в клинических образцах

Флуорофор (канал детекции), значения Ct			Результат
FAM/Green <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ROX/Orange Мутации 23S рРНК	HEX/Yellow ВКО	
Ct ≤ 38	не уч.	не уч.	ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> обнаружена
отс. или Ct > 38	не уч.	Ct ≤ 32	ДНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> не обнаружена или ниже предела обнаружения
отс. или Ct > 38	не уч.	отс. или Ct > 32	результат невалидный

При обнаружении ДНК *Mycoplasma pneumoniae* в образце далее оценивается присутствие мутации (A2063G, A2063T, A2064G или A2063C) гена 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*, ассоциированной с устойчивостью к макролидам (Таблица 9).

Таблица 9. Принцип интерпретации результатов определения мутаций гена 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*

Флуорофор (канал детекции), значения Ct				Результат
FAM/Green <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ROX/Orange Мутации 23S рРНК	$\Delta$ (Ct <sup>ROX</sup> – Ct <sup>FAM</sup> )	HEX/ Yellow ВКО	
Ct ≤ 38	Ct ≤ 38	≤ 10	не уч.	Мутация (A2063G/A2063T/A2064G/A2063C) в гене 23S рРНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , обуславливающая устойчивость к макролидам, <b>обнаружена</b>
Ct ≤ 38	Ct ≤ 38	> 10	не уч.	Мутация (A2063G/A2063T/A2064G/A2063C) в гене 23S рРНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , обуславливающая устойчивость к макролидам, <b>не обнаружена</b>
Ct ≤ 32	отс. или Ct > 38	не уч.	не уч.	Мутация (A2063G/A2063T/A2064G/A2063C) в гене 23S рРНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , обуславливающая устойчивость к макролидам, <b>не обнаружена</b>
32 < Ct ≤ 38	отс. или Ct > 38	не уч.	не уч.	Результат <b>невалидный</b> для мутаций в гене 23S рРНК <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , обуславливающих устойчивость к макролидам

Причиной получения невалидного результата может служить низкая концентрация ДНК, присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверное выполнение протокола анализа; несоблюдение температурного режима ПЦР и др.

В случае невалидного результата заключение не выдается, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

## **Диагностическое значение полученного результата исследования:**

Полученные результаты могут использоваться при диагностике инфекционных заболеваний дыхательных путей (в т.ч. пневмонии) и определении схемы терапии заболевания.

Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации в сочетании с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

## **14. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов**

### **Хранение**

Набор реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от -22 до -18 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от 2 до 8 °С до 7 суток.

Допускается заморозка/оттаивание набора «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» не более 10 раз.

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

Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

### **Транспортирование**

Транспортировать набор реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Транспортировать при температуре от -22 до -18 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 до 8 °С до 7 суток, или при температуре окружающей среды от 15 до 25 °С не более суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объем и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объем термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

### **Срок годности**

Срок годности набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при температуре от минус 22 до минус 18 °С, соблюдении всех условий транспортирования и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

**Хранение и срок годности компонентов набора после первого вскрытия упаковки**

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от -22 до -18°С.

## **15. Утилизация**

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1 3684 21 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета, кроме желтого и красного.

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1 : 100 и вывозом остатков упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

## **16. Гарантийные обязательства, контакты**

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «MYCOPLASMA-P-RESIST-TEST» требованиям ТУ при соблюдении установленных требований к транспортированию, хранению и эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен»  
(ООО «ТестГен»),  
432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13  
Тел.: +7 (499) 705-03-75  
[www.testgen.ru](http://www.testgen.ru)

### **Служба технической поддержки:**

Тел.: +7 927 981 58 81  
E-mail: [help@testgen.ru](mailto:help@testgen.ru)

## Приложение А

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2021	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Методы испытаний.
ГОСТ Р ЕН 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2024	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2024	Медицинские изделия для диагностики <i>in vitro</i> . Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики <i>in vitro</i> для профессионального использования
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Оценка стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023	Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования