

Набор реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* (L1-L3) и *Chlamydia trachomatis* (D-K) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)» по ТУ 21.20.23-181-09286667-2022

АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
2.1. Состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	5
2.3. Техническое обслуживание и ремонт	6
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	6
3.1. Внутренний контроль качества	6
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	7
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	8
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	10
6.1. Взятие исследуемого материала	10
6.2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	10
6.3. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	10
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	11
7.1. Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, полученные от мужчин	12
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	12
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала	12
8.2. Подготовка реагентов для амплификации	13
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	13
8.4. Анализ и вычисление результатов	14
8.5. Интерпретация результатов	15
8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению	16
8.7. Диагностическое значение полученного результата	16
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	17
9.1. Предел обнаружения	17
9.2. Аналитическая специфичность	17
9.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения	18
9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность	18
9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ	19
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	20
10.1. Срок годности	20
10.2. Транспортирование	20
10.3. Хранение	20
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	20
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	21

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	– внутренний контрольный образец
ГЭ	– геномные эквиваленты
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
ПКО	– положительный контрольный образец
К-	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
ТУ	– технические условия
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза
LGV	– Lymphogranuloma Venereum

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* (L1-L3) и *Chlamydia trachomatis* (D-K) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)» по ТУ 21.20.23-181-09286667-2022.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)», а также сокращение Набор реагентов.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)» предназначен для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* биоваров L1-L3, вызывающих венерическую лимфогранулему (Lymphogranuloma Venereum - LGV), и урогенитальных биоваров D-K в биологическом материале (соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, полученные от мужчин) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

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

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление ДНК *Chlamydia trachomatis* (L1-L3) и *Chlamydia trachomatis* (D-K) методом ПЦР в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике по назначению врача проктолога: как в дифференциальной диагностике заболеваний прямой кишки у мужчин, так и для мониторинга терапии. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

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

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

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

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно. Набор рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор может быть использован как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь LGV	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-буфер-Н	0,65	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО LGV	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов	—	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде ¹ на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL²) и одновременной амплификации участков ДНК *S. trachomatis* (D-K), *S. trachomatis* (L1-L3) и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО с гибридизационно-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 Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

¹ Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

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

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

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

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке амплифицируются участки ДНК *C. trachomatis* (D-K), *C. trachomatis* (L1-L3) и последовательность ВКО. Результаты амплификации регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ³	Cy5
ДНК-мишень	ДНК <i>C. trachomatis</i> (D-K)	ДНК <i>C. trachomatis</i> (L1-L3)	ДНК ВКО (экзогенный ВКО)
Область амплификации	rmpH gene	rmpH gene	Искусственно синтезированная последовательность

2.3. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

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

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должны детектироваться ДНК *C. trachomatis* (D-K), *C. trachomatis* (L1-L3). В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружены ДНК *C. trachomatis* (D-K) и/или *C. trachomatis* (L1-L3), и контроля, начиная с этапа экстракции.

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

Отрицательный контроль ПЦР (К-) тестируется, начиная с этапа амплификации, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должны детектироваться ДНК *C. trachomatis* (D-K), *C. trachomatis* (L1-L3). В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружены ДНК *C. trachomatis* (D-K) и/или *C. trachomatis* (L1-L3), и контроля, начиная с этапа амплификации.

В качестве положительного контроля используется реагент ПКО LGV, входящий в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительного контроля заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

3.1.2. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО, который добавляется в каждый исследуемый и отрицательный контрольный образец на этапе экстракции. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах, отрицательных на наличие ДНК *C. trachomatis* (D-K), *C. trachomatis* (L1-L3), не обнаружена ДНК ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

3.1.3. 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, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

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

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

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

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

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

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

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

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

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁴, биологический материал⁵, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

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

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

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

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

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

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

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

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

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

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

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

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

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

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, полученные от мужчин), содержащая буферно-солевой раствор с муколитиком, консервантом и стабилизатором (например, «Транспортная среда с муколитиком «АмплиПрайм ТСМ» (РУ № ФСР 2012/14205) или другая, зарегистрированная в РФ).

6.1.2. Зонд-тампон для взятия биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, полученные от мужчин) однократного применения, стерильный. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

6.2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.2.1. Набор реагентов для экстракции нуклеиновых кислот, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, полученные от мужчин) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 100 мкл.

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

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

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

6.3.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов:

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

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

6.3.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.

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

6.3.5. Центрифуга-вортекс.

6.3.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.3.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

6.3.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» планшетного типа, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G и Cy5 со следующими характеристиками:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
Cy5	620	640	660	690

- наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4^\circ\text{C}$;
- скорость нагрева не менее 2 °C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °C/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (ПУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (ПУ № ФСР 2011/10229).

6.3.9. Холодильник от 2 до 8 °C.

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

6.3.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат:

- соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, полученные от мужчин.

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

7.1. Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, полученные от мужчин

Перед взятием мазка провести тщательный туалет с мылом и водой области вокруг анального отверстия.

Взятие материала провести с поверхности боковых стенок ампулы прямой кишки с помощью стерильного зонда-тампона в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи, крови, гноя и каловых масс.

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

- при комнатной температуре (до 25 °С) – не более 28 суток;
 - при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание–оттаивание материала.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинично-диагностической лаборатории⁶:

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

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

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

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

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) в одном повторе.

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

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

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

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

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

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

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

Таблица 5

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь LGV	$10,0*(N+1)$	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	$5,0*(N+1)$	

8.2.2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью LGV** и **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

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

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

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

ВНИМАНИЕ! При ручном анализе программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору. При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

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

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

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

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

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

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

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G, Cy5	

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

8.3.4. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

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

8.3.6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

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

8.4. Анализ и вычисление результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

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

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

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

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

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

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	Cy5
Продукт амплификации	ДНК <i>C. trachomatis</i> (D-K)	ДНК <i>C. trachomatis</i> (L1-L3)	ДНК ВКО

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 8 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 9;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 8 и 9 соответственно.

Таблица 8

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G и Cy5 не определено или определено выше граничного ⁷	Невалидный! Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G определено не выше граничного . При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 не учитывается	ДНК <i>C. trachomatis</i> (D-K) и/или ДНК <i>C. trachomatis</i> (L1-L3) обнаружена соответственно
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G не определено или определено выше граничного , а по каналу для флуорофора Cy5 определено не выше граничного	ДНК соответствующих выявляемых микроорганизмов не обнаружена

Таблица 9

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
	FAM	R6G	Cy5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует		Определено значение Ct не выше граничного ⁷
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует		
ПКО LGV (положительный контроль ПЦР)	Определено значение Ct не выше граничного		Значение Ct отсутствует

⁷ Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК выявляемых микроорганизмов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК выявляемых микроорганизмов, начиная с этапа амплификации ДНК.

8.6.3. Для положительного контрольного образца (ПКО LGV) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G значение Ct отсутствует или определено выше граничного. Вероятна ошибка на этапе амплификации, необходимо провести повторно этап ПЦР для всех отрицательных образцов.

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

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

8.7. Диагностическое значение полученного результата

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

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения⁸

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 10).

Значения характеристики, указанные в таблице 10, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 10

Предел обнаружения набора

Микроорганизм	Предел обнаружения по Probit 95%, ГЭ/мл	95%-ый доверительный интервал, ГЭ/мл
<i>C. trachomatis</i> (D-K)	5×10^2	$4,03 \times 10^2 - 7,75 \times 10^2$
<i>C. trachomatis</i> (L1-L3)	5×10^2	$3,87 \times 10^2 - 7,04 \times 10^2$

9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)» обнаруживает только фрагменты ДНК *C. trachomatis* (D-K) и *C. trachomatis* (L1-L3).

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов и вирусов (см. таблицу 11) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК *C. trachomatis* (D-K) и *C. trachomatis* (L1-L3).

Таблица 11

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Fannyhessea vaginae</i>
<i>Mycoplasma hominis</i>	HSV I
<i>Mycoplasma genitalium</i>	HSV II
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	CMV
<i>Ureaplasma parvum</i>	HPV 16

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

⁸ Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемых возбудителей, при которой 95% тестов дают положительный результат).

9.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость результатов с использованием набора оценивали путем тестирования модельных образцов в двух концентрациях (см. таблицу 12 и 13). Модельные образцы были приготовлены разведением стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК *C. trachomatis* (D-K) и *C. trachomatis* (L1-L3), на ТЕ-буфере. Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

Таблица 12

Повторяемость измерения

Микроорганизм	Концентрация, ГЭ/мл	Среднее значение порогового цикла, $C_{т\text{р}}$	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<i>C. trachomatis</i> (D-K)	1×10^3	32,82	0,10	0,31
	5×10^2	34,56	0,09	0,26
<i>C. trachomatis</i> (L1-L3)	1×10^3	32,90	0,09	0,26
	5×10^2	34,65	0,10	0,28

Таблица 13

Воспроизводимость измерения

Микроорганизм	Концентрация, ГЭ/мл	Среднее значение порогового цикла, $C_{т\text{р}}$	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<i>C. trachomatis</i> (D-K)	1×10^3	32,80	0,10	0,29
	5×10^2	34,57	0,09	0,26
<i>C. trachomatis</i> (L1-L3)	1×10^3	32,92	0,09	0,29
	5×10^2	34,65	0,10	0,28

9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)» были использованы 150 образцов соскобного материала или отделяемого слизистой оболочки прямой кишки, полученных от мужчин.

В качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали наличие/отсутствие ДНК *C. trachomatis* (D-K), *C. trachomatis* (L1-L3), использовался набор реагентов «АмплиПрайм® *C. trachomatis*» (ПУ № РЗН 2021/15522).

Результаты тестирования набора «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)» в сравнении с набором сравнения приведены в таблице 14.

Таблица 14

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования		
Тип	Количество	Образцы	Тестируемый набор «АмплиПрайм® <i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)»	Набор сравнения «АмплиПрайм® <i>C. trachomatis</i> »
Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, полученные от мужчин	150	Положительных на ДНК <i>C. trachomatis</i> (L1-L3)	25	50
		Положительных на ДНК <i>C. trachomatis</i> (D-K)	25	
		Отрицательных	100	100

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 15.

Таблица 15

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)»**

Тип образцов	Возбудитель	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, полученные от мужчин	<i>C. trachomatis</i> (L1-L3)	100 % (86,28 % – 100 %)	100 % (97,09 % – 100 %)
	<i>C. trachomatis</i> (D-K)	100 % (86,28 % – 100 %)	100 % (97,09 % – 100 %)

9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 16, в максимально возможной концентрации.

Таблица 16

**Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора
«АмплиПрайм® *Chlamydia trachomatis* (LGV)»**

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
соскобный материал или отделяемое слизистой оболочки прямой кишки, полученные от мужчин	гемоглобин	200 мг/мл
	муцин	2,3 мг/мл
	лубрикант (интимный гель-смазка Contex Silk на силиконовой основе)	50 мкг/мл
	лубрикант (интимный гель-смазка Durex)	50 мкг/мл
	ДНК человека	1×10 ⁸ копий/мл

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

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

10.2. Транспортирование

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

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

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

10.3. Хранение

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

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

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

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

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

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

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

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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