



Набор реагентов для выявления ДНК *Cryptosporidium hominis*,
Cryptosporidium parvum, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*,
Giardia lamblia методом полимеразной цепной реакции
с детекцией в режиме «реального времени»
«АмплиПрайм® Простейшие» по ТУ 21.20.23-228-09286667-2024

АмплиПрайм® Простейшие

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



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



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1. НАЗНАЧЕНИЕ	6
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	6
2.1. Формы выпуска, состав и комплектность.....	6
2.2. Принцип метода.....	8
2.3. Техническое обслуживание и ремонт	8
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	9
3.1. Внутренний контроль качества.....	9
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы.....	10
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	10
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	11
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	12
6.1. Взятие исследуемого материала.....	12
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала.....	12
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	13
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	13
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	14
7.1. Взятие и транспортирование исследуемого материала	14
7.2. Подготовка материала к исследованию.....	15
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	15
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала.....	15
8.2. Подготовка реагентов для амплификации.....	16
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	17
8.4. Анализ и вычисление результатов.....	18
8.5. Интерпретация результатов.....	18
8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению	19
8.7. Диагностическое значение полученного результата	20
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	20
9.1. Предел обнаружения	20
9.2. Аналитическая специфичность.....	21
9.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения	21
9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность	24
9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ	25
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	26
10.1. Срок годности.....	26
10.2. Транспортирование	26
10.3. Хранение.....	26
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	26
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	27

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Сt	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	– внутренний контрольный образец
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
ПК	– положительный контроль
К-	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
ТУ	– технические условия
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для выявления ДНК *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® Простейшие» по ТУ 21.20.23-228-09286667-2024.

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

ВВЕДЕНИЕ

В зависимости от возраста и географического положения конкретные группы пациентов подвержены риску заражения определенными видами или подвидами простейших. Эти факторы также влияют, наряду с генетическими характеристиками микроорганизма и иммунным статусом хозяина, на тяжесть и продолжительность клинических проявлений.

Путешественники, посещающие страны с плохими гигиеническими стандартами, особенно в тропических регионах, подвергаются повышенному риску заражения кишечной паразитарной инфекцией. Помимо лямблиев и криптоспоридий, они легко подвержены заражению *Entamoeba histolytica* и *Cyclospora cayetanensis*.

Этиологический агент лямблиоза, *Giardia duodenalis* (синоним *G. intestinalis*, *G. lamblia*) является одним из наиболее распространенных кишечных простейших жгутиконосцев человека. Симптомы инфекции варьируются от отсутствия симптомов до острой водянистой диареи, тошноты, боли в эпигастрии и потери веса. Лямблиоз распространен по всему миру и часто встречается как у детей, так и у взрослых. Ежегодно во всем мире диагностируется 200 миллионов случаев лямблиоза.

Криптоспоридиозная инфекция протекает бессимптомно или самоограничивается у иммунокомпетентных людей, но у людей с ослабленным иммунитетом, таких как ВИЧ/СПИД, паразит вызывает тяжелую или хроническую диарею, истощение и даже смерть. Сата и его коллеги сообщили о различиях в клинических проявлениях среди видов и подтипов криптоспоридий у ВИЧ-инфицированных лиц и у детей, с *C. hominis* ассоциируется в основном с диареей, тошнотой, рвотой и недомоганием, а *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. canis* и *C. felis* ассоциируются только с диареей. Кроме того, было показано, что инфекция *C. hominis* была связана с внекишечными осложнениями (боль в суставах, боль в глазах, повторяющаяся головная боль и усталость), о которых не сообщалось у людей, инфицированных *C. parvum*.

Cyclospora cayetanensis — единственный вид рода *Cyclospora*, способный инфицировать человека. Инфекция *Cyclospora cayetanensis* зарегистрирована во всем мире, как в развитых, так и в развивающихся странах, но наиболее распространена в тропических и субтропических районах. В настоящее время эндемичными территориями считаются Центральная и Южная Америка, ряд стран Ближнего Востока (Египет, Турция), Индийский субконтинент с Непалом, Юго-Восточная Азия, включая Индонезию.

Амебиоз — заболевание, вызываемое простейшим паразитом *Entamoeba histolytica*. Амебиоз проявляет спектр симптомов, включая острую диарею, дизентерию, амебный колит и амебные абсцессы печени. Из-за серьезного воздействия *E. histolytica* классифицируется Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний США как приоритетный патоген биозащиты категории В. Человек является основным хозяином *E. histolytica*. В настоящее время амебиоз становится третьей причиной желудочно-кишечных заболеваний у возвращающихся международных путешественников после лямблиоза и кампилобактериоза.

Точная и быстрая диагностика кишечных простейших важна при выборе плана лечения, сводя к минимуму риск развития серьезного заболевания. Это также имеет значение для общественного здравоохранения, для раннего выявления вспышек и для эпидемиологического надзора, чтобы понять распространение и пути передачи возбудителя.

Литература:

1. Almeria, Sonia et al. Cyclospora cayetanensis and Cyclosporiasis: An Update. *Microorganisms* vol. 7,9 317. 4 Sep. 2019, doi:10.3390/microorganisms7090317;
2. Giangaspero, Annunziata, and Robin B Gasser. Human cyclosporiasis. *The Lancet. Infectious diseases* vol. 19,7 (2019): e226-e236. doi:10.1016/S1473-3099(18)30789-8;
3. Showler, Adrienne J, and Andrea K Boggild. Entamoeba histolytica. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de Association medicale canadienne* vol. 185,12 (2013): 1064. doi:10.1503/cmaj.121576;
4. Adam, R D. Biology of Giardia lamblia. *Clinical microbiology reviews* vol. 14,3 (2001): 447-75. doi:10.1128/CMR.14.3.447-475.2001;
5. Hooshyar, Hossein et al. Giardia lamblia infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench* vol. 12,1 (2019): 3-12;
6. Epidemiology of Cryptosporidium Infections among People Living with HIV/AIDS in Nigeria: Results of Systematic Review and Meta-analysis Solomon Ngutor Karshima, Magdalene Nguvan Karshima. *Acta Parasitol.* 2021 Mar;66(1):60-74. doi: 10.1007/s11686-020-00253-8. Epub 2020 Jul 18;
7. Bouzid, Maha et al. Cryptosporidium pathogenicity and virulence. *Clinical microbiology reviews* vol. 26,1 (2013): 115-34. doi:10.1128/CMR.00076-12;
8. Khan, Asis et al. Genomics and molecular epidemiology of Cryptosporidium species. *Acta tropica* vol. 184 (2018): 1-14. doi:10.1016/j.actatropica.2017.10.023;
9. van Lieshout, Lisette, and Jaco J Verweij. Newer diagnostic approaches to intestinal protozoa. *Current opinion in infectious diseases* vol. 23,5 (2010): 488-93. doi:10.1097/QCO.0b013e328333de0eb.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® Простейшие» предназначен для выявления ДНК возбудителей протозойных инвазий (*Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*) в биологическом материале (фекалии) 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 набора реагентов, рекомендованного в разделе инструкции «Дополнительное оборудование и материалы».

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление ДНК *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для скринингового исследования биологического материала от всех групп населения, в том числе от лиц с подозрением на наличие протозойных инвазий, 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. 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).

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

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

Форма выпуска 1 включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 или 2,0 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

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

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь Protozoa	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,60	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Protozoa	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО В	1,10	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь Protozoa	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок) ¹	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
Буфер В2	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО Protozoa	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО В	1,10	1 пробирка	Внутренний 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 (форма выпуска 1 или 2)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде ² 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	-

¹ Пробирки с голубым парафином не используются.

² Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО В) и одновременной амплификации участка ДНК *Cryptosporidium hominis* / *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента 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».

Набор 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 участок ДНК *Cryptosporidium hominis* / *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* и последовательность ВКО. Результаты амплификации регистрируются по пяти различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ³	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ДНК ВКО	ДНК <i>Cyclospora cayetanensis</i>	ДНК <i>Entamoeba histolytica</i>	ДНК <i>Cryptosporidium hominis</i> / <i>Cryptosporidium parvum</i>	ДНК <i>Giardia lamblia</i>
Область амплификации	Искусственно синтезированная последовательность	ITS1	SSU rRNA	COWP	SSU rRNA

2.3. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

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

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 контроль экстракции (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать отрицательный контроль ПЦР (К-) и положительный контроль (ПКО Protozoa). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

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

Отрицательный контроль ПЦР (К-) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем ПЦР не должна детектироваться ДНК *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* и ВКО. 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 образцов, в которых обнаружена ДНК *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* и ВКО, начиная с этапа ПЦР.

В качестве положительного контроля ПЦР используется реагент ПКО Protozoa, 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 выявляемых микроорганизмов, 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.

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контроля качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*.

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 В. Без использования ВКО В 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».

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

4.8. Не применять набор при нарушении целостности упаковки и с истекшим сроком годности.

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.

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

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

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

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

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.

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

6.1.2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл (для водянистых фекалий) или одноразовая лопатка из полипропилена/полистирола (для твердых фекалий).

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

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

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

6.2.3. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл;

6.2.4. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл;

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

6.2.6. Фосфатный буферный раствор или физиологический раствор (0,9 % раствор натрия хлорида) стерильный;

6.2.7. Глицерин (при необходимости длительного хранения);

6.2.8. Вортекс.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

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

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (фекалии) 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 прошли набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм ЮНИ» (РУ № РЗН 2019/8955) и комплект реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017).

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

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

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при использовании формы выпуска 1):

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл – для приготовления реакционной смеси;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

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

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

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

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при использовании формы выпуска 1 в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

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

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 и Cy5.5 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
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690
Cy5.5	660	690	705	750

- для приборов планшетного типа верхняя граница температурного диапазона не менее 99 °С;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,5$ °С;
- скорость нагрева не менее 1,5 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229) и Leggen-96 (РУ № РЗН 2023/21155).

6.4.9. Холодильник, поддерживающий температурный режим от 2 до 8 °С.

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

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служат фекалии;

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

7.1. Взятие и транспортирование исследуемого материала

Использовать пробы фекалий массой (объемом) примерно 1 – 3 г (1 – 3 мл). Перенести пробу в количестве 1 г (1 мл) отдельным полипропиленовым наконечником с фильтром или одноразовой лопаткой из полипропилена/полистирола в одноразовый стерильный полипропиленовый контейнер.

Условия хранения и перевозки образцов:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 7 суток

Допускается лишь однократное замораживание–оттаивание материала.

7.2. Подготовка материала к исследованию

При водянистой консистенции фекалий приготовление суспензии не требуется.

В пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида), отдельным наконечником с фильтром (или одноразовой лопаткой) внести 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендировать на вортексе до образования гомогенной суспензии.

Суспензию фекалий центрифугируют при 10–13 тыс об/мин в течение 5 мин. Используя наконечник с фильтром, из пробирки отобрать 100 мкл верхней бело-желтой части образовавшегося осадка. При отсутствии бело-желтого пограничного слоя между осадком и супернатантом отобрать 100 мкл с границы осадка или супернатанта. При отсутствии осадка отобрать 100 мкл материала со дна пробирки.

При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к приготовленной суспензии фекалий добавить глицерин в конечной концентрации 10–15 %. После тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30–40 мин пробы заморозить.

Условия хранения предварительно обработанных проб:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 7 суток;
- при температуре минус 68 °С – длительно.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинко-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.

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».

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

- объем реагента ВКО В – **10 мкл** в пробирку с 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, – **90 мкл** (при использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп») или **100 мкл** (при использовании набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ»).

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

8.2.1. При использовании формы выпуска 1

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

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

8.2.1.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси Protozoa** и **Буфера В**, 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 для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь Protozoa	$10,0 \cdot (N+1)$	N – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
Буфер В	$5,0 \cdot (N+1)$	

8.2.1.2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью Protozoa** и **Буфером В**, осадить капли на вихре.

8.2.1.3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1.1. Перемешать смесь и осадить капли на вихре.

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

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

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.2.2. При использовании формы выпуска 2

8.2.2.1. Отобрать необходимое количество стрипов с **ПЦР-смесью Protozoa** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

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

8.2.2.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл Буфера В2**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

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

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 **ПК** внести **10 мкл** реагента **ПКО Protozoa**.

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

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

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

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5	

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 минут) 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 пяти каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
Продукт амплификации	ДНК ВКО	ДНК <i>Cyclospora cayetanensis</i>	ДНК <i>Entamoeba histolytica</i>	ДНК <i>Cryptosporidium hominis</i> / <i>Cryptosporidium parvum</i>	ДНК <i>Giardia lamblia</i>

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.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 и Cy5.5 не определено или определено выше граничного ⁷ .	Невалидный!* Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналам для флуорофоров R6G, и/или ROX, и/или Cy5, и/или Cy5.5 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 FAM не учитывается.	ДНК <i>Cryptosporidium hominis</i> / <i>Cryptosporidium parvum</i> , и/или ДНК <i>Cyclospora cayetanensis</i> , и/или ДНК <i>Entamoeba histolytica</i> , и/или ДНК <i>Giardia lamblia</i> обнаружена
Значение Ct по каналам для флуорофоров R6G, и/или ROX, и/или Cy5, и/или Cy5.5 не определено или определено выше граничного, а по каналу для флуорофора FAM определено не выше граничного.	ДНК <i>Cryptosporidium hominis</i> / <i>Cryptosporidium parvum</i> , и/или ДНК <i>Cyclospora cayetanensis</i> , и/или ДНК <i>Entamoeba histolytica</i> , и/или ДНК <i>Giardia lamblia</i> не обнаружена

Таблица 9

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
ПКО Protozoa	Значение Ct отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного ⁷			
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Определено значение Ct не выше граничного ⁸	Значение Ct отсутствует			
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует				

8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров R6G, ROX, Cy5 и Cy5.5 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 ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофора FAM, R6G, ROX, Cy5 и Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемого микроорганизма, начиная с этапа амплификации ДНК.

8.6.3. Для положительного контроля ПЦР (ПКО Protozoa) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров R6G, ROX, Cy5 и Cy5.5 отсутствует или определено больше граничного. Вероятна ошибка на этапе амплификации, необходимо провести повторно этап ПЦР для всех отрицательных образцов.

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

⁸ Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

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 нуклеиновых кислот. 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 обнаружения⁹

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® Простейшие» 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

Микроорганизмы	Биологический материал	Набор для экстракции	Предел обнаружения по Probit 95 %, ГЭ/мл	95 %-ый доверительный интервал, ГЭ/мл
ДНК <i>Cyclospora cayetanensis</i>	Фекалии	«МагноПрайм ЮНИ»	5×10^2	$4,10 \times 10^2 - 6,62 \times 10^2$
		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$3,80 \times 10^2 - 6,19 \times 10^2$
ДНК <i>Entamoeba histolytica</i>		«МагноПрайм ЮНИ»	5×10^2	$4,11 \times 10^2 - 6,57 \times 10^2$
«АмплиПрайм РИБО-преп»		$4,14 \times 10^2 - 6,80 \times 10^2$		
ДНК <i>Cryptosporidium hominis</i> / <i>Cryptosporidium parvum</i>		«МагноПрайм ЮНИ»	5×10^2	$3,97 \times 10^2 - 6,20 \times 10^2$
		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$4,06 \times 10^2 - 6,65 \times 10^2$
ДНК <i>Giardia lamblia</i>		«МагноПрайм ЮНИ»	5×10^2	$3,85 \times 10^2 - 6,01 \times 10^2$
		«АмплиПрайм РИБО-преп»		$3,79 \times 10^2 - 5,98 \times 10^2$

⁹ Предел обнаружения – 95 %-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемого возбудителя, при которой 95 % тестов дают положительный результат).

9.2. Аналитическая специфичность

Набор «АмплиПрайм® Простейшие» обнаруживает только фрагмент ДНК *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК штаммов микроорганизмов (см. таблицу 11) и геномной ДНК человека. ДНК штаммов микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 5×10^6 кл/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*.

Таблица 11

Штаммы, используемые для оценки аналитической специфичности

Штаммы микроорганизмов		
штамм <i>Acinetobacter baumannii</i>	штамм <i>Klebsiella oxytoca</i>	штамм <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis 11272
<i>Bifidobacterium bifidum</i> штамм 1	штамм <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	штамм <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Gallinarum 665
штамм <i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559	штамм <i>Lactobacillus johnsonii</i>	штамм <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A-225
штамм <i>Campylobacter fetus</i> 5396	штамм <i>Lactobacillus gasseri</i>	штамм <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi H-901 ГДР/ГИСК
штамм <i>Campylobacter jejuni</i> 70.2T	штамм <i>Listeria monocytogenes</i> 766	штамм <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium 79
штамм <i>Candida albicans</i> ATCC 24433	штамм <i>Morganella morganii</i> №417	штамм <i>Shigella dysenteriae</i> I 1362
штамм <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	штамм <i>Neisseria gonorrhoeae</i> «Андреанов» 5	штамм <i>Shigella flexneri</i> 1a 8516
штамм <i>Enterobacter aerogenes</i> CCM 2531	штамм <i>Neisseria mucosa</i> ATCC 19693	штамм <i>Shigella sonnei</i> "S-форм"
штамм <i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 10005	штамм <i>Neisseria sicca</i> 5	штамм <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P
штамм <i>Enterobacter (Cronobacter) sakazakii</i> CCM 3461	штамм <i>Neisseria subflava</i> Л-1	штамм <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619
штамм <i>Enterococcus durans</i> CCM 5612	штамм <i>Pseudomonas aeruginosa</i> №453	штамм <i>Yersinia enterocolitica</i> 09-R
штамм <i>Escherichia coli</i> NCTC 12241	штамм <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony ГИСК 103/39	-

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

9.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость результатов с использованием набора оценивали путем тестирования модельных образцов. Модельные образцы были приготовлены путем контаминации образцов биоматериала, предусмотренного назначением набора, стандартными образцами предприятия, содержащими ДНК *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*. Были протестированы образцы в двух концентрациях ДНК выявляемых микроорганизмов, одна из которых соответствовала пределу обнаружения набора (5×10^2 ГЭ/мл), а вторая двукратно превышала предел обнаружения (1×10^3 ГЭ/мл). Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

Повторяемость измерения

Образец	Канал для флуорофора	Концентрация, ГЭ/мл	Среднее значение порогового цикла, Ct_{cp}	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %	
Набор реагентов для экстракции «МагноПрайм ЮНИ»						
Форма выпуска 1						
Фекалии	FAM	5×10 ²	28,99	0,29	1,02	
		1×10 ³	29,07	0,26	0,88	
	R6G	5×10 ²	36,25	0,27	0,75	
		1×10 ³	34,53	0,32	0,94	
	ROX	5×10 ²	37,55	0,24	0,63	
		1×10 ³	36,03	0,31	0,87	
	Cy5	5×10 ²	37,47	0,29	0,77	
		1×10 ³	35,73	0,29	0,81	
	Cy5.5	5×10 ²	37,26	0,27	0,73	
		1×10 ³	35,55	0,28	0,78	
	Форма выпуска 2					
	Фекалии	FAM	5×10 ²	28,99	0,32	1,12
1×10 ³			29,09	0,29	1,01	
R6G		5×10 ²	36,32	0,27	0,74	
		1×10 ³	34,46	0,31	0,89	
ROX		5×10 ²	37,71	0,30	0,80	
		1×10 ³	36,04	0,32	0,89	
Cy5		5×10 ²	37,53	0,32	0,85	
		1×10 ³	35,70	0,28	0,79	
Cy5.5		5×10 ²	37,27	0,27	0,73	
		1×10 ³	35,55	0,27	0,75	
Комплект реагентов для экстракции «АмплиПрайм РИБО-преп»						
Форма выпуска 1						
Фекалии	FAM	5×10 ²	29,07	0,29	1,00	
		1×10 ³	28,84	0,29	1,02	
	R6G	5×10 ²	36,35	0,30	0,81	
		1×10 ³	34,53	0,27	0,78	
	ROX	5×10 ²	37,69	0,27	0,73	
		1×10 ³	35,94	0,30	0,84	
	Cy5	5×10 ²	37,46	0,32	0,85	
		1×10 ³	35,73	0,26	0,72	
	Cy5.5	5×10 ²	37,34	0,31	0,83	
		1×10 ³	35,58	0,25	0,72	
	Форма выпуска 2					
	Фекалии	FAM	5×10 ²	29,05	0,28	0,96
1×10 ³			29,03	0,31	1,07	
R6G		5×10 ²	36,33	0,33	0,92	
		1×10 ³	34,52	0,28	0,81	
ROX		5×10 ²	37,74	0,31	0,82	
		1×10 ³	36,11	0,29	0,81	
Cy5		5×10 ²	37,57	0,28	0,73	
		1×10 ³	35,63	0,22	0,62	
Cy5.5		5×10 ²	37,28	0,30	0,81	
		1×10 ³	35,54	0,28	0,78	

Воспроизводимость измерения

Образец	Канал для флуорофора	Концентрация, ГЭ/мл	Среднее значение порогового цикла, Ct_{cp}	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %	
Набор реагентов для экстракции «МагноПрайм ЮНИ»						
Форма выпуска 1						
Фекалии	FAM	5×10 ²	29,23	0,39	1,34	
		1×10 ³	29,23	0,28	0,96	
	R6G	5×10 ²	36,56	0,35	0,97	
		1×10 ³	34,75	0,30	0,86	
	ROX	5×10 ²	37,88	0,40	1,06	
		1×10 ³	36,32	0,33	0,91	
	Cy5	5×10 ²	37,78	0,39	1,04	
		1×10 ³	35,92	0,42	1,18	
	Cy5.5	5×10 ²	37,51	0,37	0,97	
		1×10 ³	35,70	0,32	0,89	
	Форма выпуска 2					
	Фекалии	FAM	5×10 ²	29,25	0,41	1,41
1×10 ³			29,33	0,38	1,30	
R6G		5×10 ²	29,25	0,39	1,06	
		1×10 ³	29,33	0,40	1,15	
ROX		5×10 ²	38,02	0,38	0,99	
		1×10 ³	36,29	0,37	1,03	
Cy5		5×10 ²	37,63	0,38	1,00	
		1×10 ³	35,93	0,38	1,05	
Cy5.5		5×10 ²	37,51	0,35	0,93	
		1×10 ³	35,89	0,38	1,06	
Комплект реагентов для экстракции «АмплиПрайм РИБО-преп»						
Форма выпуска 1						
Фекалии	FAM	5×10 ²	29,24	0,33	1,13	
		1×10 ³	29,29	0,50	1,69	
	R6G	5×10 ²	36,66	0,38	1,03	
		1×10 ³	34,77	0,46	1,32	
	ROX	5×10 ²	37,99	0,39	1,04	
		1×10 ³	36,23	0,37	1,03	
	Cy5	5×10 ²	37,75	0,49	1,29	
		1×10 ³	35,88	0,34	0,94	
	Cy5.5	5×10 ²	37,56	0,42	1,11	
		1×10 ³	35,88	0,40	1,12	
	Форма выпуска 2					
	Фекалии	FAM	5×10 ²	29,24	0,43	1,47
1×10 ³			29,22	0,41	1,41	
R6G		5×10 ²	36,59	0,38	1,04	
		1×10 ³	34,75	0,42	1,21	
ROX		5×10 ²	37,96	0,41	1,09	
		1×10 ³	36,19	0,26	0,73	
Cy5		5×10 ²	37,79	0,36	0,94	
		1×10 ³	35,97	0,34	0,94	
Cy5.5		5×10 ²	37,53	0,38	1,02	
		1×10 ³	35,84	0,42	1,16	

9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® Простейшие» были использованы образцы биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов, в количестве, указанном в таблице 14.

В качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали наличие/отсутствие ДНК *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* используют набор реагентов для обнаружения ДНК возбудителей протозойных инфекций (*Lambliа Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в образцах биоматериала человека «Прото-скрин» (ПУ № РЗН 2015/2769 от 19.06.2015).

Для подтверждения положительных образцов, содержащих ДНК *Cryptosporidium hominis* и *Cyclospora cayetanensis*, после проведения амплификации на тестируемом наборе реагентов проводится секвенирование полученных фрагментов ДНК по методу Сэнгера и сравнение данных с помощью программы BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nih.gov).

Образцы, в которых по результатам тестирования испытуемым набором «АмплиПрайм® Простейшие» не выявлена ДНК *Cryptosporidia hominis*, *Cryptosporidia parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* были протестированы с использованием прямой микроскопии и микроскопии с использованием модифицированного кислотостойкого окрашивания.

Таблица 14

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® Простейшие»

Исследуемые образцы			Результаты тестирования				
Биоматериал	Возбудитель	Количество	Образцы	Тестируемый набор «АмплиПрайм® Простейшие»		Набор сравнения «Прото-скрин»	Секвенирование по Сэнгеру/Микроскопия
				Форма 1	Форма 2		
Фекалии	<i>Cryptosporidia hominis</i>	175	Положительных	Положительные ¹⁰ : 50 Отрицательные: 125	Положительные: 50 Отрицательные: 125	Не выявляет	25
			Отрицательных			Не выявляет	150
	<i>Cryptosporidia parvum</i>		Положительных	25	Тестирование не проводилось		
			Отрицательных	150	Тестирование не проводилось		
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>		Положительных	25	Не выявляет	25	
			Отрицательных	150	Не выявляет	150	
	<i>Entamoeba histolytica</i>		Положительных	25	25	25	Тестирование не проводилось
			Отрицательных	150	150	150	Тестирование не проводилось
	<i>Giardia lamblia</i>		Положительных	25	25	25	Тестирование не проводилось
			Отрицательных	150	150	150	Тестирование не проводилось

¹⁰ тестируемый набор «АмплиПрайм® Простейшие» не позволяет провести дифференциацию образцов, содержащих ДНК *Cryptosporidia hominis* и ДНК *Cryptosporidia parvum*

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® Простейшие» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 15.

Таблица 15

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиПрайм® Простейшие»

Биоматериал	Возбудитель	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Фекалии	<i>Cryptosporidia hominis / Cryptosporidia parvum</i>	100 % (97,09% – 100 %)	100 % (92,89% - 100%)
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	100 % (97,57% – 100 %)	100 % (86,28% - 100%)
	<i>Entamoeba histolytica</i>	100 % (97,57% – 100 %)	100 % (86,28% - 100%)
	<i>Giardia lamblia</i>	100 % (97,57% – 100 %)	100 % (86,28% - 100%)

9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® Простейшие» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 12, в максимально возможной концентрации.

Таблица 12

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® Простейшие»

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
Фекалии	Гемоглобин	200 мг/мл
	Билирубин	0,2 мг/мл
	Муцин	2,3 мг/мл
	Нифуроксазид	4 мг/мл
	Паста для приема внутрь «Энтеросгель»	175 мг/мл
	Хлоргексидин	0,1 %

Также не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала ДНК человека в концентрации $1,0 \times 10^8$ 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 в течение 3 месяцев в транспортной таре, 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.

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

ВНИМАНИЕ! Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси Protozoa и Буфера В, входящих в состав формы выпуска 1, хранению 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® Простейшие» 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



Номер серии



Дата изготовления



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Содержимого достаточно для проведения <n> тестов



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде



Не допускать воздействия солнечного света



Осторожно