

Amplitech СТ

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК *Chlamydia trachomatis* методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech СТ)

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

IVD

REF P008-0

 96

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ.....	4
1.1 Область применения.....	4
2 СОСТАВ.....	4
3 ПРИНЦИП МЕТОДА.....	5
3.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК U.....	5
4 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	5
5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	6
6 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	7
7 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	9
7.1 Экстракция ДНК.....	9
7.2 Подготовка к проведению ПЦР.....	9
7.3 Проведение ПЦР и детекции.....	10
8 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	10
9 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ.....	12
10 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	12
10.1 Контроли, используемые в процессе исследования.....	12
10.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации.....	13
10.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований.....	13
11 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	13
11.1 Предел обнаружения.....	13
11.2 Диапазон измерения и предел измерения.....	13
11.3 Аналитическая специфичность.....	14
11.4 Прецизионность измерения.....	15
11.5 Правильность измерения.....	15
11.6 Диагностические характеристики.....	15
11.7 Корреляция.....	15
12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.....	16
12.1 Срок годности.....	16
12.2 Хранение.....	16
12.3 Транспортирование.....	16
12.4 Эксплуатация.....	16
13 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ.....	16
14 БИБЛИОГРАФИЯ.....	17
15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ.....	17
16 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	18
17 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА.....	18
18 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	18

ВВЕДЕНИЕ

1. Настоящая инструкция по применению версии 26.08.22 распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК *Chlamydia trachomatis* методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech СТ)» по ТУ 21.20.23-014-19926214-2022 (далее – набор).

Краткое наименование набора: Amplitech СТ.

Набор следует применять в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Для удобства работы в лаборатории допускается использовать действующую версию краткого руководства по применению набора.

2. Микроорганизм *Chlamydia trachomatis* является возбудителем инфекционно-воспалительных заболеваний уrogenитального тракта. Для данного микроорганизма отсутствуют специфические клинические признаки, на основании которых можно установить этиологию заболевания. ПЦР в реальном времени обладает высокой чувствительностью, специфичностью и объективностью полученных результатов [1]. Набор реагентов «Amplitech СТ» позволяет выявлять и количественно измерять ДНК *Chlamydia trachomatis*.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

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

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

1.1 Область применения

Набор предназначен для применения в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекций, передаваемых половым путём. Отрицательные результаты исследования с помощью набора не исключают возможность инфицирования *C. trachomatis* и не должны использоваться в качестве единственной основы для принятия решения о лечении пациента. Отрицательные результаты исследования должны сочетаться с клиническими наблюдениями, историей болезни и эпидемиологической информацией.

Набор может применяться в клинико-диагностических лабораториях.

2 СОСТАВ

Состав набора¹ указан в таблице 1.

Таблица 1

Состав набора

Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
Смесь-1 СТ (Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ)	0,48	1 пробирка	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета
Смесь-2 В (Буферный раствор с сульфатом магния, термостабильной ДНК-полимеразой)	0,48	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ВК U (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с ДНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК U (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с фрагментом ДНК <i>C. trachomatis</i>)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	–	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	–	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	–	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

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

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

Набор рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.

3 ПРИНЦИП МЕТОДА

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

Таблица 2

Каналы детекции мишеней		
Канал детекции сигнала от флуорофора	Мишень	Область амплификации
FAM	ДНК <i>S. trachomatis</i>	<i>DnaB-like helicase gene</i>
Sy5	ДНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность

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

3.1 Прослеживаемость значений положительного контроля ПК U

Концентрация клонированного фрагмента ДНК *S. trachomatis* в ПК U составляет $5 \lg \pm 0,5 \lg$ копий/мл. Концентрация определяется с помощью установленной производителем методики выполнения измерений на основе метода лимитирующих разведений [2, 3].

4 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс;
- центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518);
- дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 5 до 200 мкл (РУ № ФСР 2009/05681);
- программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФС3 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФС3 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH; РУ № ФС3 2010/07595));

- штатив для пробирок объемом 0,2 и 1,5 мл;
- холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С;
- пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз, при использовании амплификаторов планшетного типа;
- пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой, одноразовые, свободные от ДНКаз, при использовании амплификаторов роторного типа;
- пробирки объемом 1,5 мл, одноразовые, свободные от ДНКаз, для приготовления реакционной смеси;
- наконечники для дозаторов переменного объема, с фильтром, объемом до 10, 100 и 200 мкл, одноразовые, свободные от ДНКаз;
- ёмкость для сброса использованных материалов;
- перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

5 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов исследования.
- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.
- Утилизировать реагенты (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения) в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических

(профилактических) мероприятий» к утилизации медицинских отходов класса Г.

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

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

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

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

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

- Не использовать набор по истечении срока годности.

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

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

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

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

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

6 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

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

- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»;

- МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории»;

- требованиями, перечисленными в таблицах 3 и 4.

Требования к взятию и предварительной обработке исследуемого материала

Взятие мазков со слизистой оболочки влагалища	
<p>Взятие материала провести с помощью стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А5 универсальный» или «Зонд тип А1 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).</p>	
Взятие соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала	
<p>Взятие материала провести с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощётки (например, «Зонд тип F3 комбинированный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) или стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А1 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).</p>	
Взятие соскобов эпителия со слизистой оболочки уретры	
<p>Взятие материала провести с помощью стерильного одноразового универсального зонда (например, «Зонд тип А3 универсальный» (ООО «Медицинские изделия», Россия; РУ № РЗН 2018/7058)) в пробирку с транспортной средой, содержащей консервант и предназначенной для хранения и транспортирования данного вида биологического материала (например, «Транспортная среда с муколитиком (ТСМ)» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или аналогичная, зарегистрированная в РФ в установленном порядке).</p>	
Взятие секрета предстательной железы	
<p>Собрать секрет простаты в количестве от 0,5 до 1 мл в специальную одноразовую ёмкость. При невозможности получить секрет сразу после массажа простаты, собрать первую порцию мочи, в которой содержится секрет предстательной железы, в количестве от 15 до 25 мл и провести её предобработку согласно порядку предобработки мочи.</p>	
Взятие и предобработка мочи	
<p>Отобрать первую порцию утренней мочи в количестве от 15 до 25 мл в специальную одноразовую ёмкость.</p> <p style="text-align: center;">Предобработка:</p> <p>Взболтать ёмкость с мочой. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку. Центрифугировать 5 мин при 10000 x g. Не захватывая осадок, полностью удалить супернатант, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник без фильтра для каждого образца. При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в 1 мл физиологического раствора стерильного, затем снова концентрировать центрифугированием и удалить супернатант, не захватывая осадок.</p> <p>К осадку добавить 200 мкл физиологического раствора стерильного. Тщательно перемешать содержимое на вортексе.</p>	

Требования к условиям транспортирования и хранения исследуемого материала

Условия транспортирования	Условия хранения
Исследуемые материалы, помещённые в транспортную среду	
<p>Согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается однократное замораживание материала.</p>	
Секрет предстательной железы	
<p>При температуре от 2 °С до 8 °С</p>	<p>• При комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С) не более 6 ч;</p>

Условия транспортирования	Условия хранения
	<ul style="list-style-type: none"> • При температуре от 2 °С до 8 °С не более суток; • При температуре минус 20 °С не более недели; • При температуре минус 70 °С длительно; • Допускается однократное замораживание материала.
Моча	
При температуре от 2 °С до 8 °С	До и после предобработки: <ul style="list-style-type: none"> • при температуре от 2 °С до 8 °С не более суток; • при температуре минус 20 °С не более недели; • при температуре минус 70 °С длительно; • Допускается однократное замораживание материала.

7 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

7.1 Экстракция ДНК

Провести экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей с использованием набора реагентов для экстракции ДНК из соответствующих видов биоматериала, например, «ДНК-100» (ООО «Ампитек»)³, согласно инструкции по его применению, с учётом требований к объёмам реагентов и образцов, указанных в таблице 5.

Таблица 5

Требования к объёмам реагентов и образцов при экстракции ДНК

Реагент/образец	Объём, мкл	Пробирка/ячейка планшета для проведения экстракции ДНК
ВК U ⁴	10	в каждую пробирку/ячейку
Исследуемый образец ⁵	100	в пробирку/ячейку для образца исследуемого материала
ОК	100	в пробирку/ячейку для отрицательного контроля (ОК)
ПК U	100	в пробирку/ячейку для положительного контроля (ПК)
Реагент для элюции ДНК	100	в каждую пробирку/ячейку

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

7.2 Подготовка к проведению ПЦР

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

7.2.1 Перемешать содержимое пробирок Смесь-1 СТ, Смесь-2 В и осадить капли на вортексе.

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

³ В ходе проведения клинических испытаний набор был валидирован с набором реагентов «ДНК-100» (ООО «Ампитек»).

⁴ При экстракции с помощью набора реагентов «ДНК-100» (ООО «Ампитек») ВК U можно не добавлять, так как внутренний контроль входит в состав Буфера А1.

⁵ Для образцов мочи необходимо провести предобработку согласно разделу 6.

Объёмы компонентов реакционной смеси

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

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

7.2.4 Внести в пробирки по 10 мкл приготовленной реакционной смеси.

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

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

7.3 Проведение ПЦР и детекции

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

Таблица 7

Программа ПЦР и детекции

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, Cy5	

Примечания

- 1) При программировании амплификатора указать объём реакции: 25 мкл.
- 2) При одновременном проведении в одном приборе тестов только для выявления ДНК допускается исключить из указанной программы цикл «50 °С – 15 мин» для экономии времени.
- 3) Детекция может назначаться по другим каналам, помимо указанных, при одновременном проведении в одном приборе нескольких тестов с использованием указанной программы.

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

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

8 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1 Проверить наличие значений Ct по каналу FAM.

- 8.2 При наличии значений Ct по каналу FAM рассчитать концентрацию ДНК *S. trachomatis* согласно формуле (1).

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

где $C_{\text{ДНК СТ}}$ – концентрация ДНК *S. trachomatis*, копий/мл;
 ΔCt – разность между значением Ct для исследуемого образца и значением Ct для ПК U по каналу FAM.

- 8.3 Рассчитать концентрацию ДНК *S. trachomatis* в геномных эквивалентах в одном миллилитре (ГЭ/мл) согласно формуле (2).

$$C_{\text{ГЭ}} = \frac{C_{\text{ДНК СТ}}}{4} \quad (2)$$

где $C_{\text{ГЭ}}$ – концентрация ДНК *S. trachomatis*, ГЭ/мл;
 $C_{\text{ДНК СТ}}$ – концентрация ДНК *S. trachomatis*, копий/мл;
 4 – коэффициент пересчёта концентрации ДНК *S. trachomatis* из копий/мл в ГЭ/мл.

- 8.4 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 8.

Таблица 8

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Качественное определение ДНК <i>S. trachomatis</i>	
По каналу Су5 значение Ct определено не больше граничного ⁶ . По каналу FAM значение Ct отсутствует.	ДНК <i>S. trachomatis</i> в образце <i>не выявлена</i> .
По каналу Су5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу FAM определено значение Ct.	В образце <i>выявлена</i> ДНК <i>S. trachomatis</i> .
По каналу Су5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналу FAM значение Ct отсутствует.	Невалидный результат
Количественное определение ДНК <i>S. trachomatis</i>	
По каналу Су5 значение Ct определено не больше граничного. По каналу FAM значение Ct отсутствует.	ДНК <i>S. trachomatis</i> в образце <i>не выявлена</i> .
Рассчитано значение концентрации ДНК <i>S. trachomatis</i> , укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК <i>S. trachomatis</i> в образце <i>выявлена</i> в концентрации в пределах диапазона измерения набора.
Рассчитано значение концентрации ДНК <i>S. trachomatis</i> , не укладывающееся в диапазон измерения набора.	ДНК <i>S. trachomatis</i> в образце <i>выявлена</i> в концентрации вне пределов диапазона измерения набора.
По каналу Су5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналу FAM значение Ct отсутствует.	Невалидный результат

⁶ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей 9.

Таблица 9

Критерии оценки для контролей

Контроль	Норма
ОК	По каналу Су5 значение Ct определено не больше граничного ⁷ . По каналу FAM значение Ct отсутствует.
ПК U	По каналам FAM, Су5 значение Ct определено не больше граничного.

9 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Рекомендации по устранению возможных ошибок, получаемых для исследуемых образцов и контролей в процессе исследования с помощью набора, указаны в таблице 10.

Таблица 10

Рекомендации по устранению ошибок

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для ПК значение Ct по каналу FAM и/или Су5 отсутствует или определено больше граничного ⁷ .	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК по каналу Су5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного.	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК по каналу FAM определено значение Ct.	Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации.	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Невалидный результат для исследуемого образца (значение Ct по каналу Су5 отсутствует или определено больше граничного, по каналу FAM значение Ct отсутствуют).	Некорректное проведение экстракции ДНК. Наличие в образце ингибиторов ПЦР.	Повторить исследование данного исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторное взятие и исследование биологического материала.

10 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

10.1 Контроли, используемые в процессе исследования

Результаты исследования контролей должны соответствовать критериям оценки, указанным в разделе 8.

10.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;

⁷ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

- ПК U для контроля корректного прохождения исследования, а также для количественного определения ДНК *S. trachomatis* в биологическом материале человека.

10.1.2 Внутренний контроль

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

10.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

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

10.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

Рекомендуется проводить контроль качества выполнения исследований с использованием панелей контрольных образцов, предназначенных для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению и количественному определению ДНК *S. trachomatis*, либо сравнительным исследованием с использованием зарегистрированных в РФ наборов реагентов для качественного и количественного определения ДНК *S. trachomatis* в биологическом материале методом ПЦР.

11 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА⁸

11.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора составляет 200 ГЭ ДНК *S. trachomatis* в 1 мл исследуемого материала (95 % ДИ: 135–302 ГЭ/мл) для всех заявленных видов биологического материала.

11.2 Диапазон измерения и предел измерения

Диапазон измерения составляет от 400 до 100000000 ГЭ ДНК *S. trachomatis* в 1 мл исследуемого материала для всех заявленных видов биологического материала. Предел измерения набора совпадает с нижней границей диапазона измерения набора.

⁸ Заявленные аналитические характеристики набора, кроме аналитической специфичности, проверены с использованием стандартного образца предприятия, содержащего вектор со специфической последовательностью ДНК *S. trachomatis*.

11.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 11, геномной ДНК человека, а также ДНК *C. trachomatis*. ДНК микроорганизмов в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК *C. trachomatis*. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 11

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

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

11.3.1 Потенциально интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующие вещества (ингибиторы ПЦР) и их максимальные концентрации в образце, для которых оценивалось их ингибирующее влияние на ПЦР, перечислены в таблице 12.

Таблица 12

Потенциально интерферирующие вещества

Исследуемый материал	Интерферент	Активный компонент	Тип интерферента	Концентрация вещества в образце	Обоснование исследованной концентрации
Мазки со слизистой оболочки влагалища, соскобы эпителия со слизистых оболочек цервикального канала, уретры	Цельная кровь	–	Эндогенная субстанция	5 % v/v	Объём в образце в условиях «наихудшего случая»
	Муцин	Очищенный белок		150 мкг/мл	
Моча (осадок первой порции)	Альбумин	Белок	Эндогенная субстанция	500 мг/л	
	Азитромицин	Азитромицин	Антибиотик-азалид	1 мг/мл	
Секрет предстательной железы	Фруктоза	–	Эндогенная субстанция	10 мг/мл	
	Ибупрофен	Ибупрофен	НПВС	300 мкг/мл	

Наличие возможного ингибирующего эффекта оценивалось путём проведения процедуры экстракции ДНК⁹ из модельных образцов биологического материала, в которые добавлялись потенциальные интерференты в концентрациях согласно

⁹ Экстракция проводилась с использованием набора реагентов «ДНК-100» (ООО «Ампитек»).

таблице 12 и стандартный образец предприятия, содержащий ДНК *C. trachomatis* в концентрации 2000 копий/мл. Далее с экстрагированными образцами проводили ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» с использованием набора реагентов «Amplitech СТ».

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

11.4 Прецизионность измерения

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

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

11.5 Правильность измерения

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

11.6 Диагностические характеристики

Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) набора с доверительной вероятностью 95 % указаны в таблице 13.

Таблица 13

Диагностические характеристики

Исследуемый материал	Количество образцов		ДЧ, %	ДС, %
	положит.	отрицат.		
Мазки со слизистой оболочки влагалища	102	100	97,1 – 100	97,0 – 100
Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала	100	100	97,0 – 100	97,0 – 100
Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры	103	102	97,1 – 100	97,1 – 100
Моча (осадок первой порции)	101	100	97,1 – 100	97,0 – 100
Секрет предстательной железы	15	60	81,9 – 100	95,1 – 100

11.7 Корреляция

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

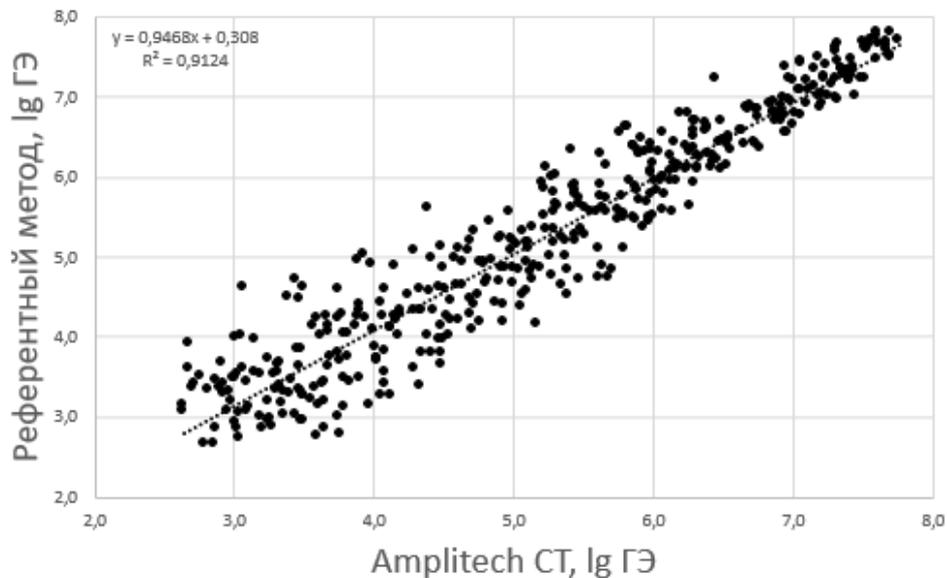


Рисунок 1

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора.

12.2 Хранение

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

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

12.3 Транспортирование

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

12.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Повторное применение использованных для исследования реагентов не допускается.

Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 18 °С до 25 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 %.

13 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

- | | |
|----|------------------------------------|
| Сt | – cycle threshold (пороговый цикл) |
| ВК | – внутренний контроль |
| ДИ | – доверительный интервал |

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
ОК	– отрицательный контроль
ПК	– положительный контроль
ПЦР	– полимеразная цепная реакция

14 БИБЛИОГРАФИЯ

1. Гущин А.Е., Рыжих П.Г., Савочкина Ю.А., Шипулина О.Ю., Шипулин Г.А. Изучение распространенности возбудителей ИППП (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*) с помощью ПЦР в реальном времени в формате «МУЛЬТИПРАЙМ» // Клиническая дерматология и венерология. – 2011. – № 9(4). – С. 90–94.
2. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies // J. Immunology. – 1981. – Vol. 126. – P. 1614–1619.
3. Allen G. Rodrigo, Paul C. Goracke, Kiarash Rowhanian, James I. Mullins. Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays // AIDS research and human retroviruses. – 1997. – Vol. 13 (9). – P. 737–742.

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

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

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

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

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

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

16 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

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

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

17 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

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

18 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Изготовитель



Номер по каталогу



Дата изготовления



Код серии



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*



Использовать до



Обратитесь к инструкции по применению



Предел температуры



Содержимого достаточно для проведения тестов



Не допускать воздействия солнечного света



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