

УТВЕРЖДАЮ

Исполнительный директор

ООО «НекстБио»

В. А. Огинский



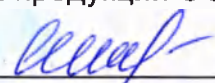
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК *NEISSERIA GONORRHOEA*, *MYCOPLASMA*
GENITALIUM И *TRICHOMONAS VAGINALIS* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ» (АМПЛИПРАЙМ® NCM(T)) ПО ТУ 21.20.23-031-09286667-2018

Инструкция по применению версии 18.02.19

Лист утверждения

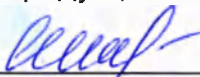
СОГЛАСОВАНО

Руководитель управления разработки
новой продукции ООО «НекстБио»


18.02.2019 М. Е. Сенина

Руководитель отдела разработки
производственной документации
ООО «НекстБио»


18.02.2019 М. Н. Гарас

Подпись и дата				
Име. № дубл.				
Взамен име №				
Подпись и дата				
Име. № подл.				
СОГЛАСОВАНО				
Руководитель управления разработки новой продукции ООО «НекстБио»				
<u></u> М. Е. Сенина				
<u>18.02.2019</u>				
Руководитель отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»				
<u></u> М. Н. Гарас				
<u>18.02.2019</u>				
Изм.	Лист	№ докум	Подпись	Дата

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» (АмплиПрайм® NCM(T)) по ТУ 21.20.23-031-09286667-2018

«АмплиПрайм® NCM(T)»

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
1. НАЗНАЧЕНИЕ	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
2.1. Формы выпуска, состав и комплектность	4
2.2. Принцип метода	6
2.3. Прослеживаемость значений калибратора ПКО STI	7
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	8
3.1. Внутренний контроль качества	8
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы	9
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ	9
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	10
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	12
6.1. Взятие исследуемого материала	12
6.2. Предварительная обработка мочи	12
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	13
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	13
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	15
7.1. Мазки со слизистой оболочки влагалища	15
7.2. Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала	16
7.3. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры	16
7.4. Мазки со слизистой оболочки прямой кишки	16
7.5. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки	17
7.6. Мазки с конъюнктивы	17
7.7. Моча	17
7.8. Секрет предстательной железы	18
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	19
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала	19
8.2. Подготовка реагентов для амплификации	20
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	21
8.4. Анализ и вычисление результатов	22
8.5. Интерпретация результатов	23
8.6. Возможные ошибки	24
8.7. Диагностическое значение полученного результата	25
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	25
9.1. Предел обнаружения	25
9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения	26
9.3. Аналитическая специфичность	26
9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения	27
9.5. Правильность измерения	28
9.6. Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность	28
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	30
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	31
12. БИБЛИОГРАФИЯ	31
13. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	32

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	– внутренний контрольный образец
ГЭ	– геномные эквиваленты
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаз	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфат
ИППП	– инфекции, передаваемые половым путем
Набор/ АмплиПрайм® NCM(T)	– Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> и <i>Trichomonas vaginalis</i> методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» (АмплиПрайм® NCM(T)) по ТУ 21.20.23-031-09286667-2018
ПК	– положительный контроль
ПКО STI	– положительный контрольный образец, ДНК-калибратор
ОК	– отрицательный контроль
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ОСО ПК	– отделяемое слизистой оболочки прямой кишки
ОСО Р	– отделяемое слизистой оболочки ротоглотки
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
СО УТ	– соскобный материал и отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта
СПЖ	– секрет предстательной железы
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиПрайм® NCM(T)» предназначен для качественного и количественного определения ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* в биологическом материале (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (влагалища, цервикального канала, уретры), прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы; моча; секрет предстательной железы) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Набор может использоваться совместно с амплификаторами с четырьмя каналам флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5. В данном случае выявление ДНК *T. vaginalis* не производится.

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

1.1. Область применения

Набор используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекций, передаваемых половым путем. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.2. Показания к применению:

Набор используется в комплексной диагностике ИППП, всех групп населения.

1.3. Противопоказания к применению:

Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требованиям инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор выпускается в двух формах (состав форм и комплектность поставки см. в таблице 1 и 2). Обе формы выпуска предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией 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, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.

Форма выпуска 2 включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 96 образцов, включая контроли. Форма может быть использована совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Таблица 1

Состав форм выпуска набора

Компонент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь NCM(T)	0,01	96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок)	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ Прозрачная жидкость, раскапана под парафин
Буфер А	0,96	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО STI	1,0	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,0	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Программное обеспечение «АмплиПрайм® NCM(T) ПО» версия 1.0	—	—	На USB флэш-накопителе, а также в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/ .
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь NCM(T)	0,96	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер А	0,96	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО STI	1,0	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,0	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Программное обеспечение «АмплиПрайм® NCM(T) ПО» версия 1.0	—	—	На USB флэш-накопителе, а также в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/ .

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1 или 2)	–	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на USB флэш-накопителе и на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/	1
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Вкладыш к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/passport/	1
Руководство оператора	в электронном виде на USB флэш-накопителе и на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной реакции амплификации участков ДНК выявляемых микроорганизмов и внутреннего контрольного образца¹ (ВКО) при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды 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».

Количественное определение ДНК выявляемых микроорганизмов основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). Для проведения количественного теста ДНК из исследуемых образцов амплифицируют одновременно с калибратором ПКО STI – образцом с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибратора проводится нормировка калибровочной линии с известной эффективностью амплификации, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

¹ ВКО (ВКО А или ВКО-FL) входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

Концентрация ДНК выявляемых микроорганизмов определяется в виде количества геномных эквивалентов² клеток микроорганизмов в 1 мл биологического образца³ (ГЭ/мл).

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

На этапе амплификации в одной пробирке одновременно амплифицируются участки ДНК выявляемых микроорганизмов и последовательность ВКО. Результаты амплификации регистрируются по четырем или пяти различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3) в зависимости от используемой модели амплификатора.

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁴	ROX	Cy5	Cy5.5
ДНК-мишень	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК ВКО	ДНК <i>T. vaginalis</i>
Область амплификации	16S rRNA gene	cryptic plasmid	gyrB gene	искусственно синтезированная последовательность	repeated DNA target

2.3. Прослеживаемость значений калибратора ПКО STI

Измерение значений концентрации калибратора ПКО STI производится относительно рабочего калибратора производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочего калибратора определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием метода цифрового ПЦР [1, 2]. Коэффициент вариации

² Геномный эквивалент - это «объем» генетического материала, соответствующий одному геному бактерии, гриба или простейшего.

³ Моча; секрет предстательной железы; соскобный материал и отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы, помещенные в транспортную среду.

⁴ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров Нех и Joe.

измерений аттестованного значения концентраций калибратора ПКО STI составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

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 и каждая индивидуальная постановка ПЦР должны включать контрольные образцы: отрицательный контроль (ОК), положительный контроль (ПК). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

В качестве отрицательного контроля используется реагент ОКО, входящий в состав набора. Отрицательный контроль тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должно детектироваться ДНК выявляемых микроорганизмов. В случае несоответствия результата для контроля заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа экстракции.

В качестве положительного контроля используется реагент ПКО STI, 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 экстракции.

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации ДНК исследуемых образцов проводится относительно количественно охарактеризованного положительного контрольного образца ПКО STI. Исследование ПКО STI проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа экстракции. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций ПКО и полученными значениями порогового цикла (Ct) для ПКО и исследуемых образцов. Для повышения точности количественной оценки дополнительно используется поправка, учитывающая эффективность экстракции ДНК из ПКО и исследуемых образцов.

3.1.3. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО⁵, который добавляется в каждый исследуемый и контрольный образец на этапе экстракции ДНК. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не обнаружена ДНК анализируемых микроорганизмов и ДНК ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции. В исследуемых образцах, в которых обнаружена ДНК выявляемых микроорганизмов, допускается наличие или отсутствие ДНК ВКО.

3.1.4. 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.

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 контролей качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК выявляемых микроорганизмов.

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

⁵ ВКО (ВКО А или ВКО-FL) входит в состав набора реагентов, рекомендованного Производителем для экстракции ДНК из исследуемого материала.

материала может привести к получению недостоверных результатов.

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

4.4. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО-FL или ВКО А, входящим в состав наборов реагентов для экстракции. Без использования ВКО невозможно провести оценку валидности постановки.

4.5. Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

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

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

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 СП 1.3.2322-08.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку⁶, биологический материал⁷, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

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 клинко-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08).

- 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

⁶ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г

⁷ Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

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.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

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

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (соскобного материала и отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы), включающая изотонический водно-солевой раствор с консервантом.

6.1.2. Зонд универсальный стерильный для забора клинического материала (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры), прямой кишки, ротоглотки и конъюнктивы), однократного применения, изготовленный из полипропилена, состоящий из головки (рабочая часть), и ручки. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

6.1.3. Емкость для взятия, транспортировки и хранения мочи (объемом до 150 мл) и секрета предстательной железы (объемом до 2 мл), однократного применения, стерильная, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой, изготовленный из полипропилена.

6.2. Предварительная обработка мочи

6.2.1. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала, содержащая консервант, или физиологический раствор (0,9 % раствор натрия хлорида) стерильный.

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

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

6.2.4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

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

6.2.6. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.2.7. Вортекс.

6.2.8. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм® ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043 от 22.01.2019) либо «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (РУ № РЗН 2015/2879 от 15.07.2015) либо любой другой рекомендованный производителем набор, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, конъюнктивы; моча, секрет предстательной железы) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;

- состав набора включает внутренний контрольный образец – реагент ВКО А или ВКО-FL;

- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;

- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 100 мкл.

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 работе с формой выпуска 2):

- закручивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 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. Вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при работе с формой выпуска 2 в случае приготовления реакционных смесей с использованием автоматической станции.

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного типа – Rotor-Gene Q, либо планшетного типа – C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96, либо аналогичный, рекомендованный производителем, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 с характеристиками, указанными в таблице 4.

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

Примечание - Допускается использование амплификаторов с 4 каналами флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5, при этом учет результатов по каналу для флуорофора Cy5.5 не производится, и ДНК *T. vaginalis* не выявляется.

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;

- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4^\circ\text{C}$;

- скорость нагрева не менее 2°C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1°C/сек.

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °C.

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:

- соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры),
- отделяемое слизистой оболочки прямой кишки (мазки),
- отделяемое слизистой оболочки ротоглотки (мазки),
- отделяемое конъюнктивы (мазки),
- моча (осадок первой порции утренней мочи),
- секрет предстательной железы.

Наиболее информативными являются исследования материала, полученного непосредственно из потенциального очага инфекционного процесса. Поскольку инфекционный процесс может захватывать несколько очагов, для получения наиболее исчерпывающей информации пробы материала необходимо брать из всех очагов, где имеются признаки воспаления или находятся клетки-мишени для инфекционных агентов. Решение о выборе места взятия исследуемого материала принимает лечащий врач в зависимости от диагностической задачи.

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. Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести из заднебокового свода влагалища с помощью стерильного одноразового зонда-тампона или универсального зонда из полипропилена/полистирола для забора клинического материала, в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда. Головка (рабочая часть) зонда может отламываться по имеющейся насечке от ручки зонда. Необходимо максимально полно собрать отделяемое. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду (включающую

изотонический водно-солевой раствор с консервантом) хранить и транспортировать в течение 7 - 28 дней, согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.2. Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном.

Взятие материала провести из цервикального канала с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощетки или универсального зонда из полипропилена/полистирола для забора клинического материала в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению цитощетки/зонда. При использовании универсального зонда объем соскобного отделяемого будет меньше. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду (включающую изотонический водно-солевой раствор с консервантом) хранить и транспортировать в течение 7 - 28 дней, согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.3. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

Перед взятием соскоба из уретры необходимо обработать наружное отверстие уретры тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором, чтобы удалить отделяемое из влагалища.

Взятие отделяемого уретры проводить с помощью стерильного одноразового универсального зонда из полипропилена/полистирола для забора клинического материала в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, включающую изотонический водно-солевой раствор с консервантом, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.4. Мазки со слизистой оболочки прямой кишки

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

Взятие материала провести с поверхности боковых стенок ампулы прямой кишки с

помощью одноразового стерильного зонда-тампона из полипропилена/полистирола с вязкой или хлопком, в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи, крови, гноя и каловых масс.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, включающую изотонический водно-солевой раствор с консервантом, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.5. Мазки со слизистой оболочки ротоглотки

Взятие материала провести с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки с помощью одноразового стерильного зонда-тампона, из полипропилена/полистирола с вязкой или хлопком, в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, включающую изотонический водно-солевой раствор с консервантом, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.6. Мазки с конъюнктивы

Взятие материала провести под местной анестезией с конъюнктивы, захватывая внешний и внутренний углы глаза, с помощью одноразового стерильного зонда-тампона, из полипропилена/полистирола с вязкой или хлопком, в пробирку с транспортной средой в соответствии с инструкцией по применению зонда.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, включающую изотонический водно-солевой раствор с консервантом, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.7. Моча

7.7.1. Порядок сбора

Женщины для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15 - 25 мл в специальную емкость из полипропилена для сбора биологического материала объемом до 150 мл, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой. Сбор мочи провести после тщательного туалета наружных половых органов. Желательно закладывать тампон во влагалище перед сбором материала для предупреждения контаминации мочи отделяемым из влагалища. Также не следует производить сбор мочи во время менструации.

У мужчин при мочеиспускании необходимо освободить наружное отверстие

мочеиспускательного канала, полностью оттянув кожную складку. Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве 15 - 25 мл в специальную емкость из полипропилена для сбора биологического материала объемом до 150 мл, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой.

В случае если сбор мочи осуществляется в емкость без реагентов для консервации и стабилизации, допускается хранение и транспортирование образцов мочи до проведения предобработки:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

При осуществлении сбора мочи в емкость с транспортной средой или реагентами для консервации и стабилизации, хранение образцов мочи до проведения предобработки проводить согласно инструкции к используемой емкости для сбора.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.7.2. Предварительная обработка

Флакон с мочой взболтать. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировать 5 мин при 10 000 g.

Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить супернатант, используя для каждого образца отдельный наконечник без фильтра, не захватывая осадок. При наличии большого количества солей ресуспендировать только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл физиологического раствора стерильного или транспортной среды, затем снова концентрировать центрифугированием и удалить супернатант, не захватывая осадок.

К осадку добавить 200 мкл физиологического раствора стерильного или транспортную среду в объеме, указанном в инструкции по ее применению. Тщательно перемешать содержимое на вортексе.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов мочи до проведения исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.8. Секрет предстательной железы

Перед получением секрета предстательной железы головку полового члена

обработать стерильным ватным тампоном. Секрет простаты забрать после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. После окончания массажа предстательной железы ее секрет в количестве 0,5–1 мл собрать в одноразовую пластиковую пробирку из полипропилена, объемом до 2 мл, с завинчивающейся или плотно защелкивающейся крышкой.

При невозможности получить секрет сразу после массажа простаты, собрать первую порцию мочи (в которой содержится секрет предстательной железы) в количестве 15–25 мл (см. порядок сбора мочи).

Допускается хранение и транспортирование образцов секрета предстательной железы до проведения исследования:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории⁸:

- 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.

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей необходимо проводить в присутствии ВКО. Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОК) в одном повторе, положительного контроля (ПК) в одном повторе.

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

- объем реагента ВКО – **10 мкл** в каждую пробирку с исследуемыми и контрольным образцами;

⁸ 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».

- объем исследуемого образца⁹ – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОК;
- объем реагента ПКО STI – **100 мкл** в пробирку для ПК;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **100 мкл**. Допускается

увеличение объема элюции до 200 мкл.

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

8.2.1. При использовании формы выпуска 1

8.2.1.1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью NCM(T)** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции.

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

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

8.2.2. При использовании формы выпуска 2

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.

8.2.2.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси NCM(T)** и **Буфера А**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь NCM(T)	$10,0 \cdot (N+1)$	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер А	$10,0 \cdot (N+1)$	

8.2.2.2. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью NCM(T) и Буфером А, осадить капли на вортексе.

8.2.2.3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в отдельную пробирку в объемах, рассчитанных в п. 8.2.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе

⁹ Для образцов мочи необходимо произвести предобработку согласно разделу «Исследуемый материал».

экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.2.5. Внести в пробирки по **20 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

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

ВНИМАНИЕ! Программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов.

8.3.2. 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, °C	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 ¹⁰ , ROX, Cy5, Cy5.5 ¹¹	

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 °C – 15 мин) для экономии времени.

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

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного

¹⁰ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров Hex и Joe.

¹¹ Допускается использование амплификаторов с четырьмя каналам флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5

типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.4. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

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

8.4. Анализ и вычисление результатов

ВНИМАНИЕ! 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.

ВНИМАНИЕ! Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору «АмплиПрайм® NCM(T) ПО» версии 1.0, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения. Руководство оператора и программное обеспечение находятся на USB флэш-носителе, входящем в состав набора, а также на официальном сайте Производителя по адресу: <http://www.nextbio.ru/reagents/>. Необходимые значения для расчета результатов 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.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по четырем или пяти каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
при использовании 4 каналов детекции					
Продукт амплификации	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК ВКО	–
при использовании 5 каналов детекции					
Продукт амплификации	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i>	ДНК <i>C. trachomatis</i>	ДНК <i>M. genitalium</i>	ДНК ВКО	ДНК <i>T. vaginalis</i>

При использовании программного обеспечения к набору на основании полученных значений Ct для образца ПК и исследуемых образцов и исходя из заданных значений концентраций для образца ПК происходит автоматический расчет значений

концентрации геномных эквивалентов ДНК выявляемых микроорганизмов в 1 мл исследуемых и контрольных образцов. Количественный анализ результатов для исследуемого образца возможен, только если по каналу для флуорофора Cy5 значение Ct для данного образца отличается от значения Ct для образца ПК не более чем на ± 3 цикла.

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов можно проводить в двух вариантах:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору «АмплиПрайм® NCM(T) ПО» версии 1.0. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 8, 9 и 10 соответственно;

- вручную в соответствии с таблицей 8 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если получены правильные результаты для контролей в соответствии с таблицей 10.

Таблица 8

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или определено больше граничного ¹² , при этом значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5.5 ¹³ отсутствуют.	Невалидный
Значение Ct для ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5 определено значение Ct не больше граничного.	ДНК выявляемых микроорганизмов не обнаружена
Значение Ct для ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> определено.	ДНК выявляемых микроорганизмов обнаружена.

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или определено больше граничного ¹² , при этом значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5.5 ¹³ отсутствуют.	Невалидный
Значение Ct для ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> и <i>T. vaginalis</i> отсутствует, а по каналу для флуорофора Cy5 определено значение Ct не больше граничного.	ДНК выявляемых микроорганизмов не обнаружена

¹² Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

¹³ Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5.5 учитывается в случае проведения амплификации и детекции с помощью пятиканального прибора.

ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора.	ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> обнаружена в концентрации менее 2×10^3 ГЭ/мл.
	ДНК <i>T. vaginalis</i> обнаружена в концентрации менее 2×10^2 ГЭ/мл.
Рассчитанное значение концентрации ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>T. vaginalis</i> (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора	ДНК выявляемых микроорганизмов обнаружена в концентрации $X \times 10^y$ ГЭ/мл.
ДНК <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>T. vaginalis</i> выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора	ДНК выявляемых микроорганизмов обнаружена в концентрации более 1×10^7 ГЭ/мл.

Таблица 10

Результаты для контролей

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора				
	FAM	R6G	ROX	Cy5	Cy5.5
ОК (отрицательный контроль)	Значение Ct отсутствует.	Значение Ct отсутствует	Значение Ct отсутствует	Определено значение Ct не больше граничного ¹⁴ .	Значение Ct отсутствует
ПК (положительный контроль)	Определено значение Ct не больше граничного по каждому каналу детекции.				

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для отрицательного контроля (ОК) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5.5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов другими образцами или продуктами амплификации на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля (ОК) по каналу для флуорофора Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. Требуется повторное исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.3. Для положительного контроля (ПК) значение Ct отсутствует или определено больше граничного по какому-либо из указанных каналов для флуорофоров (см. таблицу 10). Требуется повторное исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

¹⁴ Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.5. Для исследуемого образца по каналу для флуорофора Cy5 определено значение Ct не больше граничного, но оно отличается от значения Ct по каналу для флуорофора Cy5 для образца ПК более чем на ± 3 цикла. Для данного образца возможно проведение анализа только в качественном формате. Для проведения количественного анализа требуется повторное исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.6. Для исследуемого образца по каналу для флуорофора Cy5 значение Ct отсутствует. Для данного образца возможно проведение анализа только в качественном формате. Для проведения количественного анализа требуется повторное исследование данного образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

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

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 обнаружения¹⁵

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® NCM(T)» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 11).

Значения характеристики, указанные в таблице 11, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

¹⁵ Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК определяемого микроорганизма, при которой 95% тестов дают положительный результат).

Предел обнаружения набора

Микроорганизм	Предел обнаружения по Probit 95%, ГЭ/мл ¹⁶	95%-ый доверительный интервал, ГЭ/мл
<i>N. gonorrhoeae</i>	5×10^2	$3,09 \times 10^2 - 8,77 \times 10^2$
<i>C. trachomatis</i>	5×10^2	$2,86 \times 10^2 - 7,88 \times 10^2$
<i>M. genitalium</i>	1×10^3	$6,96 \times 10^2 - 1,70 \times 10^3$
<i>T. vaginalis</i>	50	$3,6 \times 10^1 - 7,6 \times 10^1$

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор «АмплиПрайм® NCM(T)» дает линейный ответ, приведен в таблице 12. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора.

Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 12

Линейный диапазон измерения набора

Микроорганизм	Линейный диапазон измерения, ГЭ/мл
<i>N. gonorrhoeae</i>	$2 \times 10^3 - 1 \times 10^7$
<i>C. trachomatis</i>	
<i>M. genitalium</i>	
<i>T. vaginalis</i>	$2 \times 10^2 - 1 \times 10^7$

9.3. Аналитическая специфичность

Набор «АмплиПрайм® NCM(T)» обнаруживает фрагменты ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов (см. таблицу 13) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^6 ГЭ/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемые с помощью набора микроорганизмы.

Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми микроорганизмами при тестировании ДНК микроорганизмов в концентрации не менее 1×10^7 ГЭ/мл.

¹⁶ Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ).

- в биологическом материале (соскобный материал и отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы), помещенном в транспортную среду, в пересчете на 1 мл.

Микроорганизмы, ДНК которых использовалась для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы	
<i>Treponema pallidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Neisseria flava</i>
<i>Herpes simplex virus type 1</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Herpes simplex virus type 2</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Human papilloma virus 16</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и геномной ДНК человека, а также ДНК выявляемых микроорганизмов в высоких концентрациях с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений с помощью набора «АмплиПрайм® NCM(T)» оценивали путем тестирования модельных образцов биологического материала, содержащих ДНК выявляемых микроорганизмов в трех диапазонах концентраций (см. таблицы 14 и 15). Модельные образцы были приготовлены разведением стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК выявляемых микроорганизмов, в биологическом материале, не содержащем ДНК указанных микроорганизмов и каких-либо других возбудителей ИППП. Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 40 повторях, для оценки воспроизводимости – в 80 повторях.

Таблица 14

Повторяемость измерения

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Среднее измеренное значение	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV), %
<i>N. gonorrhoeae</i>	$5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	3,90	0,11	2,8
<i>C. trachomatis</i>		3,87	0,10	2,6
<i>M. genitalium</i>		3,87	0,11	2,8
<i>T. vaginalis</i>		3,90	0,11	2,7
<i>N. gonorrhoeae</i>	$5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	4,89	0,09	1,9
<i>C. trachomatis</i>		4,87	0,11	2,2

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Среднее измеренное значение концентрации, $\log_{10}$	Стандартное отклонение (SD), $\log_{10}$	Коэффициент вариации (CV), %
<i>M. genitalium</i>	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	4,86	0,11	2,2
<i>T. vaginalis</i>		4,88	0,12	2,5
<i>N. gonorrhoeae</i>		5,86	0,12	2,0
<i>C. trachomatis</i>		5,85	0,13	2,3
<i>M. genitalium</i>		5,87	0,12	2,1
<i>T. vaginalis</i>		5,88	0,11	1,9

Таблица 15

Воспроизводимость измерения

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Среднее измеренное значение концентрации, $\log_{10}$	Стандартное отклонение (SD), $\log_{10}$	Коэффициент вариации (CV), %
<i>N. gonorrhoeae</i>	$5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	3,87	0,11	2,8
<i>C. trachomatis</i>		3,86	0,11	2,9
<i>M. genitalium</i>		3,87	0,11	2,8
<i>T. vaginalis</i>		3,89	0,10	2,7
<i>N. gonorrhoeae</i>	$5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	4,88	0,09	1,9
<i>C. trachomatis</i>		4,87	0,12	2,4
<i>M. genitalium</i>		4,85	0,11	2,2
<i>T. vaginalis</i>		4,89	0,12	2,4
<i>N. gonorrhoeae</i>	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	5,85	0,13	2,2
<i>C. trachomatis</i>		5,85	0,14	2,4
<i>M. genitalium</i>		5,86	0,14	2,3
<i>T. vaginalis</i>		5,87	0,12	2,1

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с помощью набора «АмплиПрайм® NCM(T)» была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в 104 повторях (см. таблицу 16).

Таблица 16

Правильность измерения

Микроорганизм	Среднее значение измерения, $\log_{10}$	Установленное значение концентрации, $\log_{10}$	Систематическая погрешность, (В)	
			$\log_{10}$	%
<i>N. gonorrhoeae</i>	4,81	4,70	0,11	2,31
<i>C. trachomatis</i>	4,78	4,70	0,08	1,70
<i>M. genitalium</i>	4,72	4,70	0,02	0,51
<i>T. vaginalis</i>	4,80	4,70	0,10	2,20

9.6. Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность

Для определения диагностических характеристик набора «АмплиПрайм® NCM(T)» были использованы 500 образцов соскобного материала и отделяемого слизистых

оболочек урогенитального тракта (СО УТ), 300 образцов отделяемого слизистой оболочки прямой кишки (ОСО ПК), 300 образцов отделяемого слизистой оболочки ротоглотки (ОСО Р), 300 образцов отделяемого конъюнктивы, 350 образцов секрета предстательной железы (СПЖ), 500 образцов мочи, полученных от пациентов с подозрением на урогенитальную инфекцию, с вагинитом, цервицитом, уретритом, проктитом, конъюнктивитом, фарингитом и простатитом.

В качестве референтного метода, с помощью которого устанавливали наличие или отсутствие ДНК определяемых микроорганизмов, использовался набор реагентов для определения ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики in vitro «АмплиПрайм® NCMT» (РУ № ФСР 2015/3168).

Результаты тестирования набора в сравнении с референтным методом приведены в таблице 17. ДНК *M. genitalium* и *T. vaginalis* не были выявлены в образцах отделяемого слизистых оболочек прямой кишки, ротоглотки и конъюнктивы, а ДНК *C. trachomatis* в образцах отделяемого слизистой оболочки ротоглотки в связи с тем, что данные места взятия биологического материала не являются распространенными областями локализации указанных микроорганизмов.

Таблица 17

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® NCM(T)»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования								
Тип	Количество	«Ампли Прайм® NCM(T)»	Референтный метод							
			N. gonorrhoeae		C. trachomatis		M. genitalium		T. vaginalis	
			положительных	отрицательных	положительных	отрицательных	положительных	отрицательных	положительных	отрицательных
СО УТ	500	положительных	104	0	102	0	108	0	101	0
		отрицательных	0	396	0	398	0	392	0	399
ОСО ПК	300	положительных	101	0	103	0	0	0	0	0
		отрицательных	0	199	0	197	0	300	0	300
Моча	500	положительных	102	0	115	0	108	0	104	0
		отрицательных	0	398	0	385	0	392	0	396
ОСО Р	300	положительных	105	0	0	0	0	0	0	0
		отрицательных	0	195	0	300	0	300	0	300
Отделяемое конъюнктивы	300	положительных	101	0	106	0	0	0	0	0
		отрицательных	0	199	0	194	0	300	0	300
СПЖ	350	положительных	109	0	113	0	113	0	111	0
		отрицательных	0	241	0	237	0	237	0	239

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® NCM(T)» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблицах 18 и 19 соответственно.

Таблица 18

Диагностическая специфичность набора

Тип образцов	Диагностическая специфичность, %			
	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>T. vaginalis</i>
соскобный материал и отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	99,2 – 100	99,3 – 100	99,2 – 100	99,3 – 100
отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	98,5 – 100	98,5 – 100	99,0 – 100	99,0 – 100
моча	99,3 – 100	99,2 – 100	99,2 – 100	99,2 – 100
отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	98,5 – 100	99,0 – 100	99,0 – 100	99,0 – 100
отделяемое конъюнктивы	98,5 – 100	98,5 – 100	99,0 – 100	99,0 – 100
секрет предстательной железы	98,8 – 100	98,7 – 100	98,7 – 100	98,8 – 100

Таблица 19

Диагностическая чувствительность набора

Тип образцов	Диагностическая чувствительность, %			
	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>T. vaginalis</i>
соскобный материал и отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	97,2 – 100	97,1 – 100	97,3 – 100	97,1 – 100
отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	97,1 – 100	97,1 – 100	–	–
моча	97,1 – 100	97,4 – 100	97,3 – 100	97,2 – 100
отделяемое слизистой оболочки ротоглотки	97,2 – 100	–	–	–
отделяемое конъюнктивы	97,1 – 100	97,2 – 100	–	–
секрет предстательной железы	97,3 – 100	97,4 – 100	97,4 – 100	97,3 – 100

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

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

10.2. Транспортирование

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

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

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

10.3. Хранение

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

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. При использовании формы выпуска 2 реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси NCM(T) и Буфера А, хранению не подлежит.

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

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® NCM(T)» 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. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Pavšič J., Devonshire A., Blejec A., et al. Inter-laboratory assessment of different digital PCR platforms for quantification of human cytomegalovirus DNA. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2017; 409: 2601–2614.
2. Hayden R.T., Gu Z., Sam S.S., et al. Comparative evaluation of three commercial quantitative cytomegalovirus standards by use of digital and real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2015; 53(5): 1500-1505.

13. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ



Номер по каталогу



Изготовитель



Код партии



Дата изготовления



Медицинское изделие для
диагностики *in vitro*



Использовать до



Содержимого достаточно для
проведения n-количества
тестов



Температурный диапазон



Обратитесь к инструкции по
применению



Не допускать попадания
солнечного света

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито
34 лист (а/ов)

Исполнительный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Некстбио»

В.А. Огинский



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 34 ЛИСТОВ

«20» 02 2019 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМЦЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус Т.К.



ФГАОУ ВО РУДН

Прошито в количестве ____ лист (а/ов)

Первый проректор – проректор по
научной работе

Н.С. Кирабаев

