

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НекстБио»

А. В. Смирнов



ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ
ОБРАБОТКИ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ И ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

«АМПЛИПРАЙМ® AV ПО» ВЕРСИЯ 1.0

Руководство оператора версии 29.07.19

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Руководитель отдела разработки
производственной документации
ООО «НекстБио»

М. Н. Гарас
30.07.2019

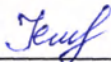
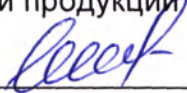
Специалист по документации отдела
разработки производственной
документации ООО «НекстБио»

Е. А. Князева
29.07.2019

Руководитель управления разработки
новой продукции ООО «НекстБио»

М. Е. Сенина
30.07.2019

2019

Подпись и дата					
Инв. № дубл.					
Взамен инв. №					
Подпись и дата					
Инв. № подл.					
СОГЛАСОВАНО					
Руководитель отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»		Специалист по документации отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»			
 _____ М. Н. Гарас		 _____ Е. А. Князева			
<u>30.07.2019</u>		<u>29.07.2019</u>			
Руководитель управления разработки новой продукции ООО «НекстБио»					
 _____ М. Е. Сенина					
<u>30.07.2019</u>					
2019					
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	

Программное обеспечение для автоматической обработки
исходных данных и получения результатов

«АмплиПрайм[®] AV ПО» версия 1.0

РУКОВОДСТВО ОПЕРАТОРА

2019



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

АННОТАЦИЯ

Настоящий документ представляет собой руководство оператора по применению программного обеспечения «АмплиПрайм® AV ПО» версии 1.0 (далее по тексту – ПО), предназначенного для автоматической обработки исходных данных и результатов, полученных при применении набора реагентов для количественного определения ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® AV» по ТУ 21.20.23-034-09286667-2018.

В данном программном документе описан принцип работы ПО, определены условия, необходимые для его успешного функционирования, указана последовательность действий оператора при запуске и работе с ПО, приведены системные сообщения, выдаваемые в ходе работы с ПО, и соответствующие действия оператора при их получении.

СОДЕРЖАНИЕ

АННОТАЦИЯ	2
СОДЕРЖАНИЕ	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ ПРОГРАММЫ	5
2. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ	5
3. ПРИНЦИП РАБОТЫ	6
4. ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ	6
4.1. Загрузка и запуск программы	6
4.2. Обновление программы	6
4.3. Выполнение программы	7
4.4. Сохранение результатов анализа и расчета	10
4.5. Завершение работы программы	11
5. СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ	11
5.1. Статус контрольных образцов	11
5.2. Статус исследуемых образцов	13
6. ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА	14

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ГЭ	– геномные эквиваленты
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ОК	– отрицательный контроль
ПК	– положительный контроль
ПО	– программное обеспечение

1. НАЗНАЧЕНИЕ ПРОГРАММЫ

Программное обеспечение «АмплиПрайм® AV ПО» версии 1.0 предназначено для автоматической обработки исходных данных и получения формализованных результатов при использовании набора реагентов для количественного определения ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® AV» по ТУ 21.20.23-034-09286667-2018.

ПО позволяет проводить автоматическую обработку и анализ исходных данных, полученных в программном обеспечении используемого амплификатора с детекцией в режиме «реального времени», а также автоматическую интерпретацию результатов и формировать бланк с формализованными результатами.

ПО предназначено для работы на персональных компьютерах в учреждениях медицинского профиля (клинико-диагностических лабораториях), применяющих в своей работе набор реагентов «АмплиПрайм® AV».

ПО предоставляется на USB флэш-накопителе в составе набора реагентов «АмплиПрайм® AV», а также в электронном виде на официальном сайте Производителя по адресу: <http://www.nextbio.ru/reagents/>.

2. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ

2.1. Минимальный состав технических средств

Минимальный состав используемых технических средств включает:

а. Компьютер со следующими характеристиками:

- Операционная система Windows 7 и выше;
- Оперативная память объемом не менее 2 Гб;
- Процессор с тактовой частотой не менее 1,5 ГГц.

б. Устройство для вывода бланка с результатами на печать (опционально).

2.2. Минимальный состав программных средств

Минимальный состав используемых программных средств включает:

- а. Операционную систему Windows 7 и выше;
- б. Microsoft .NET Framework 4.5 и выше.

2.3. Требования к пользователю (оператору)

Пользователями ПО (операторами) должны являться сотрудники клинико-диагностической лаборатории, обладающие практическими навыками работы с персональным компьютером.

3. ПРИНЦИП РАБОТЫ

В качестве исходных данных ПО использует значения порогового цикла амплификации (Ct) исследуемых образцов и контролей по соответствующим каналам для флуорофоров.

Для начала работы исходные данные должны быть получены в программном обеспечении используемого прибора, в соответствии с инструкцией по применению к используемому прибору.

Поля вкладки ПО «Параметры» заполняют значениями из вкладыша к используемой серии набора реагентов «АмплиПрайм® AV». Далее значения порогового цикла (Ct) по каждому каналу флуоресцентной детекции размещают во вкладке ПО «Расчет результатов» в соответствующих столбцах таблицы «Данные прибора».

После нажатия кнопки «Расчет результатов» ПО автоматически проводит расчет концентрации специфических мишеней, оценку полученных значений для контрольных образцов в соответствии с заданными критериями и интерпретацию результатов.

4. ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ

4.1. Загрузка и запуск программы

Запустить инсталлятор ПО, находящийся на USB флэш-накопителе¹ или загруженный с официального сайта Производителя по ссылке: <http://www.nextbio.ru/reagents/>. Следовать указаниям в появившемся окне Мастера установки. После установки ПО на рабочем столе автоматически будет создан ярлык (рис. 1).



Рисунок 1

Для запуска программы необходимо запустить ярлык с рабочего стола.

4.2. Обновление программы

После запуска ПО автоматически проверяет наличие обновления. В случае если обновление доступно, предлагается его загрузить и установить (рис. 2).

¹ Поставляется в составе набора реагентов «АмплиПрайм® AV».

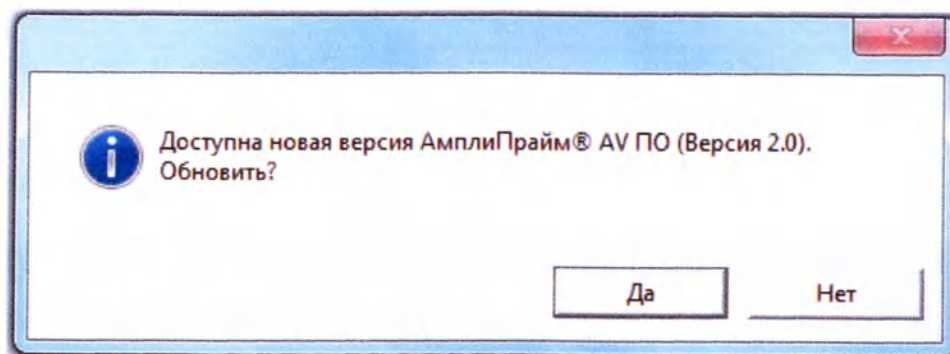


Рисунок 2

При нажатии кнопки «Да» будет загружен инсталлятор с обновлением, по окончании загрузки будет выдано сообщение о готовности обновления к установке (рис. 3).

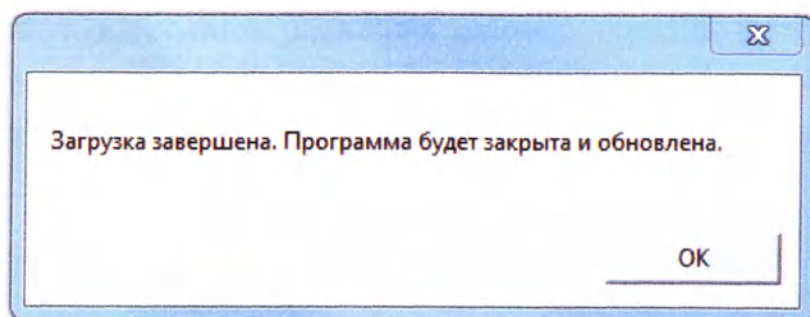


Рисунок 3

После нажатия кнопки «ОК» программа закроется, и инсталлятор с обновлением будет запущен. Для установки обновления ПО необходимо следовать указаниям Мастера установки.

4.3. Выполнение программы

Для проведения анализа исходных данных необходимо внести значения во вкладку «Параметры» и в таблицу «Данные прибора» во вкладке «Расчет результатов».

4.3.1. Заполнение таблицы «Параметры»

Пустые поля таблицы «Параметры» (рис. 4) должны быть заполнены в соответствии с вкладышем к используемой серии набора реагентов «АмплиПрайм® AV».

Параметры				
	Green FAM Enterob.	Yellow R6G Staph. spp.	Orange ROX Strep. spp.	Red Cy5 BKO
Значения концентраций, ГЭ/мл				
ПК	60000	60000	60000	—
Граничные значения порогового цикла (Ct)				
ПК	—	—	—	—
ОК	—	—	—	—
Исследуемые образцы	ОПРЕДЕЛЕНО	ОПРЕДЕЛЕНО	ОПРЕДЕЛЕНО	—
Граничные значения концентраций, ГЭ/мл				
ОК	—	—	—	—

Рисунок 4

4.3.2. Заполнение таблицы «Данные прибора»

Для проведения корректной обработки данных заполнение таблицы «Данные прибора» (рис. 5) во вкладке «Расчет результатов» должно проводиться без ошибок.

Данные прибора (значения Ct)					
№	Образец	Green FAM Enterob.	Yellow R6G Staph. spp.	Orange ROX Strep. spp.	Red Cy5 BKO
1					
2					
3					
4					
5					

Рисунок 5

Столбцы таблицы следует заполнять путем копирования данных (значений Ct) непосредственно из программного обеспечения прибора, используемого для проведения амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, либо из файла экспорта данных в Microsoft Excel, соблюдая при этом соответствие каналов для флуорофоров.

В ПО предусмотрено копирование данных без заголовков столбцов. Для этого используется кнопка «Игнорировать заголовки столбцов при копировании» (рис. 6).



Рисунок 6

По умолчанию функция копирования данных без заголовков столбцов включена. Если изначально возможно внесение данных без заголовков столбцов, функцию необходимо отключить путем нажатия кнопки (рис. 6), чтобы избежать потери данных для первого образца.

В столбец «Образец» необходимо внести обозначения исследуемых и контрольных образцов. Обозначение контрольных образцов вносить строго в

соответствии с таблицей 1. В случае правильного обозначения контролей цвет их названия меняется с черного на синий.

Таблица 1

Обозначение контрольных образцов

Контрольный образец	Возможные обозначения
Отрицательный контроль	РУС: ОК или ок
Положительный контроль	РУС: ПК или пк

4.3.3. Заполнение таблицы «Информация о постановке»

В ПО предусмотрена возможность сохранять дополнительную информацию о проведении анализа. Для этого следует заполнить поля таблицы «Информация о постановке» (рис. 7) во вкладке «Расчет результатов». Открыть или свернуть таблицу возможно либо нажатием на поле «Информация о постановке» левой клавишей мыши, либо нажатием на стрелку в левой части поля «Информация о постановке».

Информация о постановке	
Дата постановки	ДД.ММ.ГГГГ
Оператор	
Серия набора реагентов	
Прибор	

Рисунок 7

Поле «Дата постановки» автоматически заполняется текущей датой, которую можно изменить вручную.

В поле «Серия набора реагентов» следует указать серию набора реагентов «АмплиПрайм® AV», использованную для проведения ПЦР-исследования образцов.

Поле «Оператор» заполняют при необходимости данными об операторе, проводящем исследование.

В поле «Прибор» вносят при необходимости информацию об использованном амплификаторе с детекцией в режиме «реального времени».

4.3.4. Выполнение функции расчета и интерпретации результатов

По окончании заполнения необходимой информации в таблицах, указанных в пунктах 4.3.1. - 4.3.3. следует произвести расчет результатов путем нажатия кнопки «Расчет результатов».

В таблице «Результаты» (рис. 8) будут отражены:

- расчетные данные (концентрации в ГЭ/мл),
- информация о наличии/отсутствии исследуемых микроорганизмов,
- статус валидности исследуемого образца,

- статус валидности контрольных образцов.

Данные прибора (значения Ct)						Результаты (концентрация, ГЭ/мл)				
№	Образец	Green FAM	Yellow R6G	Orange ROX	Red Cy5	№	Green FAM	Yellow R6G	Orange ROX	Статус
		Enterob.	Staph. spp.	Strep. spp.	BKO		Enterob.	Staph. spp.	Strep. spp.	
1	1	24,1			29,89	1	Сбой BKO!			Невалидный.
2	2				26,87	2				Не обнаружено
3	3		28,37		24,64	3		7,76E+03		Обнаружено ДНК: Staph. spp.
4	4	36,46	25,89	13,86	25,99	4	< 3E+03	1,1E+05	> 1E+09	Обнаружено ДНК: Enterob., Staph. spp., Strep. spp.
5	ПК	26,46	25,89	28,86	25,11	5				Ок
6	ОК				26,25	6				Ок

Рисунок 8

После получения результатов необходимо проверить статус образцов, обращая особое внимание на контрольные образцы. Интерпретацию статуса исследуемых образцов и контролей смотрите в разделе «Сообщения оператору».

4.3.5. Выполнение функции очистки исходных данных и результатов

В случае если необходимо произвести расчет с новыми исходными данными, для очистки таблиц с внесенными исходными и расчетными данными следует воспользоваться кнопкой «Очистить данные и результаты» (рис. 9), располагающейся во вкладке «Расчет результатов».



Рисунок 9

4.4. Сохранение результатов анализа и расчета

Перед завершением работы ПО следует сохранить бланк с результатами расчета и их интерпретацией, нажав кнопку «Сохранить бланк результатов» (рис. 10), располагающуюся во вкладке «Расчет результатов», и введя имя сохраняемого файла в открывшемся диалоговом окне. Бланк результатов может быть сохранен в формате PDF или XPS.



Рисунок 10

При нажатии кнопки «Экспорт результатов» (рис. 11) во вкладке «Расчет результатов» информация будет сохранена в файле формата CSV для последующего редактирования в MS Excel.



Рисунок 11

ПО позволяет напечатать бланк с полученными результатами. Для этого необходимо нажать кнопку «Печать бланка результатов» (рис. 12) во вкладке «Расчет результатов».



Рисунок 12

При нажатии кнопки «Копировать результаты» (рис. 13) во вкладке «Расчет результатов» данные прибора и полученные результаты будут скопированы в буфер обмена.



Рисунок 13

4.5. Завершение работы программы

Завершение работы ПО обеспечивается стандартными средствами операционной системы. Для завершения работы ПО следует нажать кнопку «Закрыть» в правом верхнем углу окна ПО.

Если после выполнения расчета результаты не были сохранены, то при закрытии окна программы будет предложено их сохранить (рис. 14). В случае положительного ответа результаты будут сохранены в файле формата CSV.

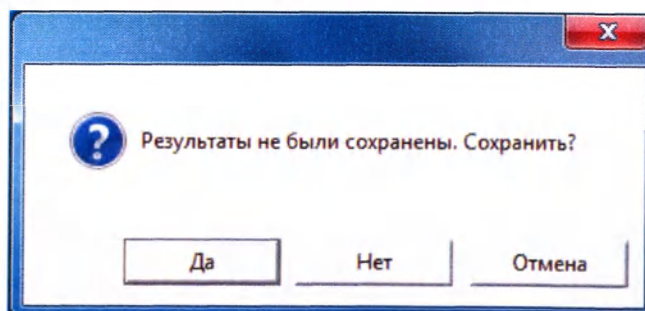


Рисунок 14

5. СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ

5.1. Статус контрольных образцов

5.1.1. Успешное прохождение контролей

ПО автоматически проверяет наличие обязательных контролей (ПК и ОК) в постановке. В случае успешного прохождения контрольных образцов, в столбце «Статус» таблицы «Результаты» выдается сообщение «Ок».

5.1.2. Отсутствие контролей

Если при проведении расчета отсутствуют валидный ПК и/или ОК, ПО выдает соответствующее сообщение (рис. 15, 16), расчет не производится.

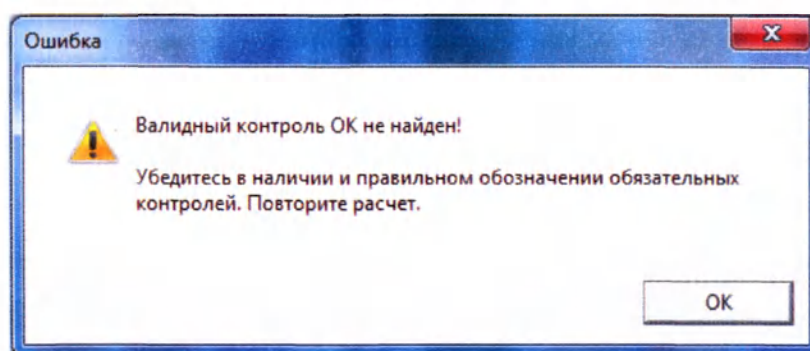


Рисунок 15

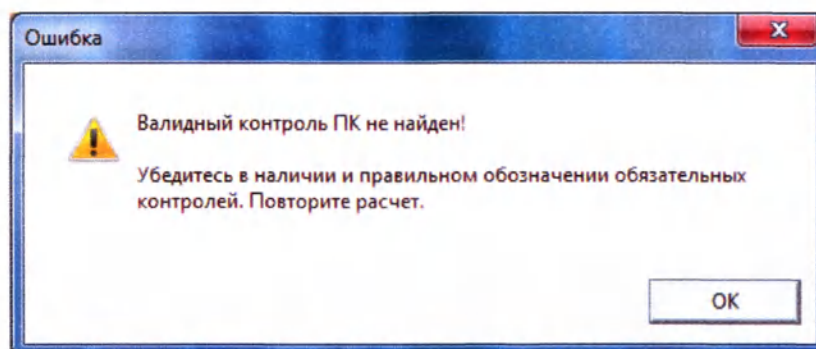


Рисунок 16

Действия оператора: Следует проверить правильность обозначения контрольных образцов. Если анализируемые образцы обозначены правильно и контроли все-таки отсутствуют, требуется провести повторное исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

5.1.3. Получение невалидного результата для контролей

5.1.3.1. Если для контрольного образца ОК по каналу для флуорофора Су5 значение C_t отсутствует или определено больше граничного, указанного во вкладыше, расчет не производится. ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 15), а в таблице «Результаты» в столбце «Статус» для образца ОК появляется сообщение «Сбой!».

Действия оператора: Требуется повторное исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

5.1.3.2. В случае если для контрольного образца ОК по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX определено значение концентрации больше граничного значения, указанного во вкладыше, расчет не производится. ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 15), в таблице «Результаты» в столбце «Статус» для ОК выдается сообщение «Контаминация?», а в соответствующих ячейках для отображения концентрации - количественные результаты в ГЭ/мл.

Действия оператора: 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.

5.1.3.3. Если для контрольного образца ПК по какому-либо из детектируемых каналов значение C_t отсутствует или определено больше граничного значения, указанного во вкладыше, расчет не производится. ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 16), а в таблице «Результаты» в столбце «Статус» для ПК появляется сообщение «Сбой!».

Действия оператора: Требуется повторное исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

5.2. Статус исследуемых образцов

5.2.1. Результаты анализа исследуемых образцов

5.2.1.1. В случае отсутствия ДНК выявляемых микроорганизмов в исследуемом образце ячейки для отображения концентрации в таблице «Результаты» остаются пустыми, а в столбце «Статус» выводится сообщение: «Не обнаружено».

5.2.1.2. В случае наличия ДНК выявляемых микроорганизмов в исследуемом образце в таблице «Результаты» выводятся количественные результаты в ГЭ/мл в соответствующих ячейках для отображения концентрации, а в столбце «Статус» выводится сообщение: «Обнаружено ДНК:...».

5.2.1.3. Если для исследуемого образца получен количественный результат больше верхней границы линейного диапазона измерения, данные представляются в виде «> 1E+09»; если результат меньше нижней границы линейного диапазона - в виде «< 3E+03».

5.2.2. Невалидные результаты для исследуемых образцов

В случае если для исследуемого образца значение C_t по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или определено больше граничного, указанного во вкладыше, и/или отличается от значения C_t для образца ПК более чем на ± 3 цикла, в таблице «Результаты» его статус выдается как «Невалидный», а в ячейках для отображения концентрации выводится сообщение «Сбой ВКО!» по каналу, по которому детектируется ДНК выявляемого микроорганизма.

Действия оператора: Необходимо повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие и исследование биологического материала.

6. ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если у вас возникли какие-либо вопросы или трудности с использованием программного обеспечения «АмплиПрайм® AV ПО», пожалуйста, свяжитесь с нами по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: <http://www.nextbio.ru>.

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

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью

«НекстБио»

А.В. Смирнов





Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: <http://www.nextbio.ru/reagents/>.

Краткое руководство

по применению набора реагентов для количественного определения ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® AV» по ТУ 21.20.23-034-09286667-2018

«АмплиПрайм® AV»

Форма выпуска 2

REF X

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

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь AV	Прозрачная жидкость	0,96	1 пробирка
Буфер А	Прозрачная жидкость	0,96	1 пробирка
ПКО STI		1,0	1 пробирка
ОКО		1,0	1 пробирка
Программное обеспечение «АмплиПрайм® AV ПО» версия 1.0	На USB флэш-накопителе		
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.			

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ отделяемое слизистой оболочки влагалища (мазки).

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 2
Инструкция по применению	в электронном виде на USB флэш-накопителе и по адресу: http://www.nextbio.ru/reagents/
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: http://www.nextbio.ru/passport/
Краткое руководство	в бумажном виде
Вкладыш	в бумажном виде
Руководство оператора	в электронном виде на USB флэш-накопителе и по адресу: http://www.nextbio.ru/reagents/

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°C ... 8°C в защищенном от света месте

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® AV». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля)
ПКО STI	100 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл ¹	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объемы реагентов, необходимые для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь AV	10,0*(N+1)	N – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер А	10,0*(N+1)	

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

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

2. Перемешать ПЦР-смесь AV и Буфер А и осадить капли на вортексе.
3. Приготовить реакционную смесь, добавив компоненты в отдельную пробирку в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции.
5. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 20 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки для исследуемых и контрольных образцов
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для ОК (отрицательного контроля)
Пробы ДНК, экстрагированной из ПКО STI	в пробирку для ПК (положительного контроля)

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

6. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

¹ Допускается увеличение объема элюции до 200 мкл.

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, ROX, Cy5	

Примечания

- 1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.
 - 2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °C – 15 мин) для экономии времени.
 7. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.
- Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
8. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ 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.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов провести в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору «АмплиПрайм® AV ПО» версии 1.0 согласно руководству оператора по применению программного обеспечения. Руководство оператора и программное обеспечение находятся на USB флэш-накопителе, 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.

Лист регистрации изменений

[illegible]

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

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстБио»

А.В. Смирнов



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НекстБио»

А. В. Смирнов



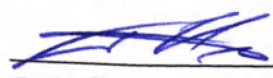
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК
ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, СТАФИЛОКОККОВ И СТРЕПТОКОККОВ МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ
«РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» «АМПЛИПРАЙМ® AV»
ПО ТУ 21.20.23-034-09286667-2018

Краткое руководство по применению формы выпуска 1 версии 29.07.19

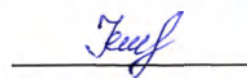
Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

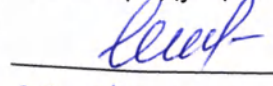
Руководитель отдела разработки
производственной документации
ООО «НекстБио»

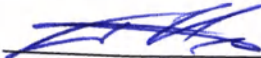
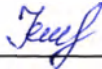
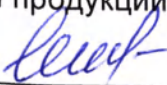

30.07.2019 М. Н. Гарас

Специалист по документации отдела
разработки производственной
документации ООО «НекстБио»


29.07.2019 Е. А. Князева

Руководитель управления разработки
новой продукции ООО «НекстБио»


30.07.2019 М. Е. Сенина

Подпись и дата					
Инв. № дубл.					
Взамен инв. №					
Подпись и дата					
Инв. № подл.					
СОГЛАСОВАНО					
Руководитель отдела разработки					
производственной документации					
ООО «НекстБио»					
 М. Н. Гарас					
<u>30.07.2019</u>					
Специалист по документации отдела					
разработки производственной					
документации ООО «НекстБио»					
 Е. А. Князева					
<u>29.07.2019</u>					
Руководитель управления разработки					
новой продукции ООО «НекстБио»					
 М. Е. Сенина					
<u>30.07.2019</u>					
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: <http://www.nextbio.ru/reagents/>.

Краткое руководство

по применению набора реагентов для количественного определения ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® AV» по ТУ 21.20.23-034-09286667-2018

«АмплиПрайм® AV»

Форма выпуска 1

REF X



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

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь AV	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин	0,01	96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок)
Буфер А	Прозрачная жидкость	0,96	1 пробирка
ПКО STI		1,0	1 пробирка
ОКО		1,0	1 пробирка
Программное обеспечение «АмплиПрайм® AV ПО» версия 1.0	На USB флэш-накопителе		
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 96 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 1
Инструкция по применению	в электронном виде на USB флэш-накопителе и по адресу: http://www.nextbio.ru/reagents/
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: http://www.nextbio.ru/passport/
Краткое руководство	в бумажном виде
Вкладыш	в бумажном виде
Руководство оператора	в электронном виде на USB флэш-накопителе и по адресу: http://www.nextbio.ru/reagents/

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°C ... 8°C в защищенном от света месте

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® AV». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
ВКО	10 мкл	в каждую пробирку
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля)
ПКО STI	100 мкл	в пробирку для ПК (положительного контроля)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл ¹	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с ПЦР-смесью AV для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции.
2. Внести в подготовленные пробирки Буфер А и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
Буфер А	в пробирки с ПЦР-смесью AV на поверхность парафина ВНИМАНИЕ! Буфер А не должен проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для ОК (отрицательного контроля)
Пробы ДНК, экстрагированной из ПКО STI	в пробирку для ПК (положительного контроля)

3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

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, ROX, Cy5	

Примечания

- 1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.
- 2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °C – 15 мин) для экономии времени.
4. Установить стрипы в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется предварительно осадить капли со стенок пробирок на вортке.

¹ Допускается увеличение объема элюции до 200 мкл.

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ 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.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов провести в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору «АмплиПрайм® AV ПО» версии 1.0 согласно руководству оператора по применению программного обеспечения. Руководство оператора и программное обеспечение находятся на USB флэш-накопителе, 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.

Лист регистрации изменений

[illegible]

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

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстБю»

А.В. Смирнов



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НекстБио»

А. В. Смирнов

30.07.2019



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК
ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, СТАФИЛОКОККОВ И СТРЕПТОКОККОВ МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ
«РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» «АМПЛИПРАЙМ® AV»
ПО ТУ 21.20.23-034-09286667-2018

Инструкция по применению версии 29.07.19

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Руководитель отдела разработки
производственной документации
ООО «НекстБио»

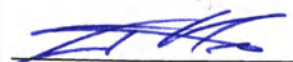
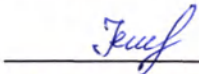
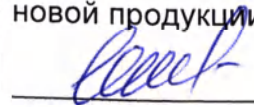
[Signature] М. Н. Гарас
30.07.2019

Специалист по документации отдела
разработки производственной
документации ООО «НекстБио»

[Signature] Е. А. Князева
29.07.2019

Руководитель управления разработки
новой продукции ООО «НекстБио»

[Signature] М. Е. Сенина
30.07.2019

Подпись и дата					
Инв. № дубл.					
Взамен инв. №					
Подпись и дата					
Инв. № подл.					
СОГЛАСОВАНО					
Руководитель отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»		Специалист по документации отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»			
 М. Н. Гарас		 Е. А. Князева			
<u>30.07.2019</u>		<u>29.07.2019</u>			
Руководитель управления разработки новой продукции ООО «НекстБио»					
 М. Е. Сенина					
<u>30.07.2019</u>					
Изм.	Лист	№ докум.	Подпись	Дата	

Набор реагентов для количественного определения ДНК энтеробактерий,
стафилококков и стрептококков методом полимеразной цепной реакции с детекцией
в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® AV»
по ТУ 21.20.23-034-09286667-2018

«АмплиПрайм® AV»

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
1.1. Область применения	4
1.2. Показания к применению	4
1.3. Противопоказания к применению	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. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	12
6.3. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов	13
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ	14
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	15
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала	15
8.2. Подготовка реагентов для амплификации	15
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции	16
8.4. Анализ и вычисление результатов	17
8.5. Интерпретация результатов	18
8.6. Возможные ошибки	19
8.7. Диагностическое значение полученного результата	20
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	20
9.1. Предел обнаружения	20
9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения	20
9.3. Аналитическая специфичность	21
9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения	22
9.5. Правильность измерения	23
9.6. Оценка влияния интерферирующих веществ и ДНК человека	23
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА	24
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	24
12. БИБЛИОГРАФИЯ	25
13. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Сt	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	– внутренний контрольный образец
ГЭ	– геномные эквиваленты
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфат
ИППП	– инфекции, передаваемые половым путем
Набор/ АмплиПрайм® AV	– Набор реагентов для количественного определения ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® AV» по ТУ 21.20.23-034-09286667-2018
ПК	– положительный контроль
ПКО STI	– положительный контрольный образец, ДНК-калибратор
ОК	– отрицательный контроль
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначен для количественного определения ДНК аэробных микроорганизмов (энтеробактерий семейства *Enterobacteriaceae*, включая *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. и др.; стафилококков (*Staphylococcus* spp.); стрептококков (*Streptococcus* spp.)) в биологическом материале (отделяемое слизистой оболочки влагалища) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

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

1.1. Область применения

Набор используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от женщин с подозрением на аэробный вагинит. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.2. Показания к применению

Набор используется в комплексной диагностике аэробного вагинита.

1.3. Противопоказания к применению

Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований 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 AV	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® AV ПО» версия 1.0	—	—	На USB флэш-накопителе.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь AV	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® AV ПО» версия 1.0	—	—	На USB флэш-накопителе.

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.

¹ВКО (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 различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G ⁴	ROX	Cy5
ДНК-мишень	ДНК <i>Enterobacteriaceae</i>	ДНК <i>Staphylococcus</i> spp.	ДНК <i>Streptococcus</i> spp.	ДНК ВКО
Область амплификации	16S rRNA gene	16S rRNA gene	16S rRNA gene	искусственно синтезированная последовательность

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

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

³ Отделяемое слизистой оболочки влагалища, помещенное в транспортную среду.

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

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 ДНК выявляемых микроорганизмов не должна детектироваться в концентрации, превышающей граничное значение, указанное во вкладыше, прилагаемом к набору. 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 результат для ВКО не соответствует заданным критериям, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

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 материала может привести к получению недостоверных результатов.

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

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

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

4.5. При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

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

4.7. 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 клинико-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.

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.

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

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

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

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 (отделяемого слизистой оболочки влагалища), содержащая изотонический водно-солевой раствор с консервантом.

6.1.2. Зонд универсальный стерильный для забора клинического материала (отделяемое слизистой оболочки влагалища), однократного применения, изготовленный из полипропилена, состоящий из головки (рабочая часть) и ручки. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

6.2. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.2.1. 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 (отделяемое слизистой оболочки влагалища) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;

- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;

- 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.

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

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

6.3.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при работе с формой выпуска 2):

- завинчивающиеся 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.

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

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

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

6.3.5. Вортекс.

6.3.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

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

6.3.8. 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 с характеристиками, указанными в таблице 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

- 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 $2^\circ\text{C}/\text{сек}$;

- скорость охлаждения не менее $1^\circ\text{C}/\text{сек}$.

6.3.9. Холодильник от 2 до 8 °C.

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

6.3.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит отделяемое слизистой оболочки влагалища (мазки).

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

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 (содержащую 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.

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.

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

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;
- объем исследуемого образца – 100 мкл в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОК – 100 мкл в пробирку для ОК;
- объем реагента ПК О 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 AV 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 Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

8.2.2. 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 AV** 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 AV	$10,0 \cdot (N+1)$	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 AV 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 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).

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 ⁹ , ROX, Cy5	

Примечание - С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °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 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® AV ПО» версии 1.0 согласно руководству оператора по применению программного обеспечения. Руководство оператора и программное обеспечение находятся на USB флэш-накопителе, входящем в состав набора, а также на официальном сайте Производителя по адресу: <http://www.nextbio.ru/reagents/>.

⁹ Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров Nex и Joe.

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 каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5
Продукт амплификации	ДНК <i>Enterobacteriaceae</i>	ДНК <i>Staphylococcus</i> spp.	ДНК <i>Streptococcus</i> spp.	ДНК ВКО

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.

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретация результатов проводится автоматически с использованием программного обеспечения к набору «АмплиПрайм® AV ПО» версии 1.0. Используемые в программном обеспечении алгоритмы интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 8 и 9 соответственно.

Таблица 8

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 отсутствует или определено больше граничного ¹⁰ и/или отличается от значения Ct для образца ПК более чем на ± 3 цикла.	Невалидный
Значение Ct для ДНК <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. и <i>Streptococcus</i> spp. отсутствует.	ДНК выявляемых микроорганизмов не обнаружена.
ДНК <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. и <i>Streptococcus</i> spp. выявлена в концентрации меньше нижнего предела линейного диапазона измерения набора.	ДНК выявляемых микроорганизмов обнаружена в концентрации менее 3×10^3 ГЭ/мл.
Рассчитанное значение концентрации ДНК <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. и <i>Streptococcus</i> spp. (ГЭ/мл) находится в пределах линейного диапазона измерения набора.	ДНК выявляемых микроорганизмов обнаружена в концентрации $X \times 10^Y$ ГЭ/мл.

¹⁰ Граничные значения Ct и граничные значения концентрации указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Результат	Интерпретация
ДНК <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. и <i>Streptococcus</i> spp. выявлена в концентрации выше верхнего предела линейного диапазона измерения набора.	ДНК выявляемых микроорганизмов обнаружена в концентрации более 1×10^9 ГЭ/мл.

Таблица 9

Результаты для контролей

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G	ROX	Cy5
ОК (отрицательный контроль)	Значение концентрации отсутствует или определено не больше граничного ¹⁰ .	Значение концентрации отсутствует или определено не больше граничного.	Значение концентрации отсутствует или определено не больше граничного.	Определено значение Ct не больше граничного.
ПК (положительный контроль)	Определено значение Ct не больше граничного ¹⁰ и рассчитана концентрация 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 определено значение концентрации больше граничного. 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 9). 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 уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.5. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие и исследование 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 обнаружения¹¹

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

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

Таблица 10

Предел обнаружения набора

Микроорганизм	Предел обнаружения по Probit 95%, ГЭ/мл ¹²	95%-ый доверительный интервал, ГЭ/мл
<i>Enterobacteriaceae</i>	1×10^3	$7,00 \times 10^2 - 1,59 \times 10^3$
<i>Staphylococcus</i> spp.	1×10^3	$6,55 \times 10^2 - 1,53 \times 10^3$
<i>Streptococcus</i> spp.	1×10^3	$5,90 \times 10^2 - 1,62 \times 10^3$

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор «АмплиПрайм® AV» дает линейный ответ, приведен в таблице 11. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора.

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

¹¹ Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК определяемого микроорганизма, при которой 95% тестов дают положительный результат).

¹² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в биологическом материале (отделяемое слизистой оболочки влагалища), помещенном в транспортную среду, в пересчете на 1 мл.

Линейный диапазон измерения набора

Микроорганизм	Линейный диапазон измерения, ГЭ/мл
<i>Enterobacteriaceae</i>	$3 \times 10^3 - 1 \times 10^9$
<i>Staphylococcus</i> spp.	
<i>Streptococcus</i> spp.	

9.3. Аналитическая специфичность

Набор «АмплиПрайм® AV» обнаруживает фрагменты ДНК *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp. и *Streptococcus* spp., включая *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов (см. таблицу 12) 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.

Таблица 12

Микроорганизмы, ДНК которых использовалась для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы	
<i>Herpes simplex virus type 1</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Herpes simplex virus type 2</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Human papilloma virus 16</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Atopobium vaginae</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Trichomonas vaginalis</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® AV» оценивали путем тестирования модельных образцов биологического материала, содержащих ДНК выявляемых микроорганизмов в трех диапазонах концентраций (см. таблицу 13 и 14). 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 13

Повторяемость измерения

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Среднее измеренное значение концентрации, $\log_{10}$	Стандартное отклонение (SD), $\log_{10}$	Коэффициент вариации (CV), %
<i>Enterobacteriaceae</i>	$5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	3,87	0,14	3,6
<i>Staphylococcus</i> spp.		3,89	0,16	4,1
<i>Streptococcus</i> spp.		3,85	0,16	4,2
<i>Enterobacteriaceae</i>	$5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	4,89	0,13	2,6
<i>Staphylococcus</i> spp.		4,90	0,11	2,3
<i>Streptococcus</i> spp.		4,87	0,13	2,7
<i>Enterobacteriaceae</i>	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	5,86	0,15	2,6
<i>Staphylococcus</i> spp.		5,84	0,17	2,9
<i>Streptococcus</i> spp.		5,84	0,15	2,6

Таблица 14

Воспроизводимость измерения

Микроорганизм	Исходное значение концентрации, ГЭ/мл	Среднее измеренное значение концентрации, $\log_{10}$	Стандартное отклонение (SD), $\log_{10}$	Коэффициент вариации (CV), %
<i>Enterobacteriaceae</i>	$5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	3,81	0,17	4,6
<i>Staphylococcus</i> spp.		3,83	0,17	4,4
<i>Streptococcus</i> spp.		3,81	0,17	4,6
<i>Enterobacteriaceae</i>	$5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	4,88	0,14	2,8
<i>Staphylococcus</i> spp.		4,89	0,13	2,7
<i>Streptococcus</i> spp.		4,88	0,13	2,6
<i>Enterobacteriaceae</i>	$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	5,85	0,17	2,9
<i>Staphylococcus</i> spp.		5,81	0,17	3,0
<i>Streptococcus</i> spp.		5,85	0,17	2,8

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с помощью набора «АмплиПрайм® AV» была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в 104 повторях (см. таблицу 15).

Таблица 15

Правильность измерения

Микроорганизм	Среднее значение измерения, $\log_{10}$	Установленное значение концентрации, $\log_{10}$	Систематическая погрешность (В)	
			$\log_{10}$	%
<i>Enterobacteriaceae</i>	4,83	4,70	0,13	2,67
<i>Staphylococcus spp.</i>	4,87	4,70	0,17	3,71
<i>Streptococcus spp.</i>	4,85	4,70	0,15	3,13

9.6. Оценка влияния интерферирующих веществ и ДНК человека

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в отделяемом слизистой оболочки влагалища, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® AV» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам отделяемого слизистой оболочки влагалища на этапе экстракции следующих интерферирующих веществ в максимально возможной концентрации для данного вида биоматериала:

- муцина в концентрации 0,23 мг/100 мкл;
- гемоглобина в концентрации 0,20 мМ/100 мкл;
- мочевины в концентрации 0,033 мМ/100 мкл;
- лубрикантов в концентрации 5 мкг/100 мкл;
- семенной жидкости в концентрации 5 мкг/100 мкл;
- мирамистина в концентрации действующего вещества 0,001%;
- итраконазола в концентрации 6,5 мкг/100 мкл;
- метронидазола в концентрации 5 мкг/100 мкл;
- дидрогестерона в концентрации 5 мкг/100 мкл;
- прогестерона в концентрации 5 мкг/100 мкл.

Также при использовании набора «АмплиПрайм® AV» не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам отделяемого слизистой оболочки влагалища искусственно-синтезированной ДНК человека в максимально возможной концентрации ($7,5 \times 10^5$ - $3,0 \times 10^6$ ГЭ/мл) для данного вида биоматериала.

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 AV 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® AV» 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



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

Согласовано:

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П. К. Варнавичус

Лист регистрации изменений

[illegible]

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

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстБио»

А.В. Смирнов



ФГАОУ ВО РУДН

Прошито в количестве 28 лист (а/ов)

И.о. первого проректора – проректор
по научной работе

П.А. Докукин



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 28 ЛИСТОВ

201 9 год

Ген. Директор
ООО «ВЫИЩЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Барнавичус П.К.

