



ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*
«Набор реагентов для выявления и идентификации *Chlamydia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis*
методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени
ДИПЛЕКС Ct+Tv для диагностики *in vitro*»
по ТУ 9398-312-17253567-2016

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Tv** предназначен для одновременного выявления и идентификации ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией и возможностью количественной оценки результатов анализа в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, секрет предстательной железы, осадок мочи, отделяемое конъюнктивы).

Область применения набора - дерматовенерология; поддержка клинической лабораторной диагностики инфекций передаваемых половым путем (ИППП).

Показания к применению. Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Tv** может быть использован в клинической лабораторной диагностике для выявления носительства возбудителей ИППП *Chlamydia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis*, а также для оценки эффективности терапии хламидийной и трихомониазной инфекции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Состав набора.

Набор **ДИПЛЕКС Ct+Tv** выпускается в 5 вариантах исполнения.

Варианты исполнения набора различаются степенью готовности реагентов к проведению анализа (нераскапанный, OneStep, TwoStep) (табл. 1).

Таблица 1

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	ДИПЛЕКС Ct+Tv-PB-120	1. Реакционная смесь PB 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	1 пробирка – 960 мкл 1 пробирка – 50 мкл 2 пробирки – по 2 мл 1 пробирка – 200 мкл
2	ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-60	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	60 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл
3	ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-96	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	96 пробирок по 28 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл
4	ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-60	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	60 пробирок по 21 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 500 мкл
5	ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-96	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	96 пробирок по 21 мкл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 800 мкл

Набор рассчитан на проведение анализа 60, 96 или 120 образцов, включая контрольные образцы, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты.

В состав реакционной (амплификационной) смеси входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (3 зонда): зонд для специфического фрагмента одного возбудителя содержит флуорофор FAM, зонд для специфического фрагмента второго возбудителя содержит флуорофор ROX, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX.
- праймеры для выявления внутреннего контроля (геномная ДНК человека); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения ДНК.

Амплификационная смесь комплектаций **OneStep** полностью готова к амплификации, содержит Taq-полимеразу;

Реакционная смесь комплектаций **TwoStep** требует внесения Taq-полимеразы, входящей в состав комплекта.

ПКО ИППП представляет собой количественно охарактеризованную смесь 12 плазмид со встроенной вставкой специфических фрагментов геномов возбудителей ИППП (*C.trachomatis*, *T.vaginalis*, *N.gonorrhoeae*, *M.genitalium*, *U.parvum*, *U.urealyticum*, *M.hominis*, *Ureaplasma spp.*, *HSV type 1*, *HSV type 2 CMV*) и человека в диапазоне $5 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^4$ ГЭ/мл. Во вкладыше к каждой серии набора реагентов указана точная концентрация плазмид в образце ПКО ИППП, а также диапазон допустимых значений циклов пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (Ct) для ПКО ИППП на различных типах амплификаторов.

2.2. Принцип метода.

Набор реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Tv** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Trichomonas vaginalis* путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 2 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК).
2. Проведение ПЦР-амплификации с детекцией результатов в режиме «реального времени».

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе.

Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце.

При количественной оценке значение Ct (цикл пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией) исследуемого образца сравнивается со значением Ct ПКО (положительного

контрольного образца) с известной концентрацией. Концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* и – при необходимости – ДНК человека в образце вычисляется по формуле:

$$C_{\text{Образца}} = C_{\text{ПКО}} * 2^{(Ct_{\text{ПКО}} - Ct_{\text{Образца}})}$$

$C_{\text{Образца}}$ – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце, выраженная в геном-эквивалентах/мл,

$C_{\text{ПКО}}$ – концентрация плазмиды, несущей специфический фрагмент ДНК соответствующего возбудителя (или человека), в ПКО, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору),

$Ct_{\text{Образца}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$Ct_{\text{ПКО}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции положительного контрольного образца с пороговой линией;

Концентрация ДНК возбудителя может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. При этом концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК Chl.tr.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000$$

концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК Trich.vag.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000$$

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК Chl.tr.}}$ – вычисленная концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* в образце

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК Trich.vag.}}$ – вычисленная концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* в образце

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}$ – вычисленная концентрация ДНК человека в образце

Количественная оценка необходима для мониторинга и корректировки лечения, а также для учёта погрешностей, связанных с забором материала.

2.3. Ограничения метода.

1) Метод ПЦР позволяет определять ДНК как в живых, так и в мертвых микроорганизмах. Поэтому ПЦР анализ клинических образцов следует проводить до начала антибиотикотерапии; в случае приема антибиотиков анализ проводится не раньше четырех - пяти недель после завершения курса лечения для определения эффективности терапии.

2) При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с ДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции, а также занижение реального содержания ДНК возбудителя в клиническом образце.

3) Вследствие того, что содержание криптической плазмиды в клетке *Chlamydia trachomatis*, может варьировать от 4 до 9, количественная оценка наличия плазмидной ДНК не может полностью коррелировать с содержанием данного возбудителя в клиническом образце. По этой причине предлагаемый метод определения концентрации позволяет получить лишь оценочное представление о содержании *Chlamydia trachomatis* в клиническом образце.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана производителем при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, *HSV 1 u 2 muna*, *CMV*, *HPV* (типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), а также геномной ДНК человека. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были. Специфичность, рассчитанная как частота ложноположительных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

3.2. Аналитическая чувствительность

С помощью набора ДИПЛЕКС Ct+Tv можно обнаружить:

- $5 \cdot 10^2$ и более геном-эквивалентов/мл *Chlamydia trachomatis* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе;
- 10^3 и более геном-эквивалентов/мл *Trichomonas vaginalis* в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе.

Ген-мишень для *Chlamydia trachomatis* находится на криптической плазмиде, копияность которой варьирует от 4 до 9, за 1 геном-эквивалент производителем набора реагентов принято значение 5.

3.3. Тест на прецизионность

Тест на прецизионность характеризуется рассеянием значений измеренных концентраций, получаемых при использовании набора относительно величины средней концентрации. Для образцов с концентрацией 10^5 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis* и $2 \cdot 10^5$ геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* коэффициент вариации составляет не более 10%.

3.4. Тест на правильность определения концентрации

Тест на правильность определения – при детекции образцов с концентрациями $2 \cdot 10^7$, $2 \cdot 10^5$ и $2 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* и 10^7 , 10^5 и 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis* процент отклонения измеренной концентрации от значения, принимаемого за истинное, находится в диапазоне 90-110%.

3.5. Диапазон линейности

Диапазон линейности – это диапазон концентраций, при детекции которых зависимость между значениями Ct и log концентрации удовлетворяет линейной модели. Модуль коэффициента корреляции для образцов с концентрациями $2 \cdot 10^7$, $2 \cdot 10^5$ и $2 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* и 10^7 , 10^5 и 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis* составляет не менее 0,99. Таким образом, диапазон линейности составляет от $2 \cdot 10^7$ до $2 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл для *Trichomonas vaginalis* и от 10^7 до 10^3 геном-эквивалентов/мл для *Chlamydia trachomatis*.

4. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Для определения диагностической чувствительности и специфичности были проанализированы 360 образцов отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, 151 образец отделяемого конъюнктивы, 280 образцов осадка мочи и 172 образца секрета предстательной железы, полученных от пациентов с подозрением на урогенитальную инфекцию, с вагинитом, цервицитом, уретритом, конъюнктивитом, простатитом.

4.1. Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность определялась как доля, выраженная в %, истинно положительных результатов ко всем получившимся положительными, включая ложноположительные и составила 100%. Для расчета нижней границы интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью $C = 90\%$ использовалась следующая формула:

$$(1-C/100)^{1/n} * 100\%, \text{ где:}$$

n – общее число исследуемых проб с истинно положительными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

C – доверительная вероятность, в данном исследовании принята равной 90%. Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 90% составила:

Таблица 2

Возбудитель	Клинический материал	Число образцов с истинно положительным и результатами	Результаты набора ДИПЛЕКС Ct+Tv		Диагностическая чувствительность
			Положительные	Отрицательные	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	122	122	0	98,13-100%
	Отделяемое конъюнктивы	58	58	0	96,11-100%
	Осадок мочи	136	136	0	98,32-100%
	Секрет предстательной железы	69	69	0	96,72-100%
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта	93	93	0	97,55-100%
	Осадок мочи	52	52	0	95,67-100%
	Секрет предстательной железы	61	61	0	96,30-100%

4.2. Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определялась как доля, выраженная в %, истинно отрицательных ко всем получившимся отрицательными и составила 100%. Для расчета нижней границы интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической специфичности с доверительной вероятностью $C = 90\%$ использовалась следующая формула:

$$(1-C/100)^{1/n} * 100\%, \text{ где:}$$

n – общее число исследуемых проб с истинно положительными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

C – доверительная вероятность, в данном исследовании принята равной 90%. Нижняя граница интервала, в котором находится «истинное» значение диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 90% составила:

Возбудитель	Клинический материал	Число образцов с истинно отрицательными результатами	Результаты набора ДИПЛЕКС St+Tv		Диагностическая специфичность
			Положительные	Отрицательные	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	238	0	238	99,04-100%
	Отделяемое конъюнктивы	93	0	93	97,55-100%
	Осадок мочи	144	0	144	98,41-100%
	Секрет предстательной железы	103	0	103	97,79-100%
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	267	0	267	99,14-100%
	Осадок мочи	228	0	228	99,00-100%
	Секрет предстательной железы	111	0	111	97,95-100%

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

5.2. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических 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».

5.3. При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III–IV групп



патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

Для всех вариантов исполнения набора

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5 - 50 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 10 и 100 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

Для комплектаций Нераскапанный РВ дополнительно:

- **бесцветные** одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации.
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 200 и до 1000 мкл;

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

7.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Материал для исследования.

Соскоб из уретры или цервикального канала, секрет предстательной железы, осадок мочи. Для определения ДНК *C.trachomatis* используют также соскоб с конъюнктивы глаз.

Взятие материала осуществляется одноразовым стерильным зондом.

За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры. В связи с тем, что хламидия трахоматис является внутриклеточным паразитом и размножается только внутри клеток цилиндрического эпителия уретры или цервикального канала для получения адекватного результата необходимо, чтобы исследуемый материал содержал возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи и примеси крови. Присутствие в исследуемом материале большого количества слизи и примеси крови могут привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам.

Особенности взятия материала из уретры.

- перед взятием материала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5 – 2 часов;
- непосредственно перед взятием материала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором;
- при наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 минут после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия материала;
- у женщин перед введением зонда в уретру проводится ее массаж о лобковое сочленение;
- в уретру у женщин зонд вводится на глубину 1,0 – 1,5 см, у мужчин – на 3 – 4 см и затем совершается несколько вращательных движений; у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры;

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл

стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия материала из цервикального канала.

- перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;
- зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5 – 1,5 см;
- при наличии эрозий цервикального канала необходимо их обработать стерильным физиологическим раствором, и материал следует брать на границе здоровой и измененной ткани;
- при извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание со стенками влагалища.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия секрета предстательной железы.

Перед взятием секрета простаты головка полового члена обрабатывается стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором. Секрет простаты берется после предварительного массажа простаты через прямую кишку. Врач проводит массаж с надавливанием несколькими энергичными движениями от основания к верхушке. Затем из кавернозной части выдавливается простатический секрет, который собирается в стерильную емкость (сосуды с широким горлом, пробирки). После взятия секрета простаты он должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-3 часов. Транспортировка биологического материала должна производиться только в сумке-холодильнике.

Особенности взятия (сбора) мочи.

Мочу собирают утром натощак после сна или не ранее чем через 2-3 часа после последнего мочеиспускания.

При сборе мочи желательно использовать специальный контейнер для сбора мочи. Минимальный объем мочи необходимый для проведения анализа составляет 20 мл.

Если в лабораторию доставляется не вся собранная моча, то перед тем, как часть мочи сливается в посуду для транспортировки, ее необходимо тщательно взболтать.

Собранную мочу доставляют в лабораторию в течение 1-3 часов без дополнительного охлаждения. Длительное хранение мочи при комнатной температуре до исследования приводит к изменению не только ее физических свойств и к разрушению клеток, но и к размножению бактерий.

Особенности взятия материала с конъюнктивы глаз.

При наличии обильного гнойного отделяемого его убирают стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором.

Соскоб берут с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. При взятии соскоба необходимо придерживать веко руками, чтобы при моргании ресницы не касались зонда.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического

материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладоэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

7.2. Предварительная обработка клинического материала.

Обработка клинического материала для выделения ДНК, а также его хранение производится согласно инструкции производителя набора для выделения ДНК из клинического материала.

7.3. Выделение ДНК.

Для подготовки образцов ДНК могут быть использованы любые зарегистрированные на территории РФ реагенты, предназначенные для выделения ДНК из клинического материала для ПЦР-диагностики урогенитальных инфекций.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения ДИПЛЕКС Ct+Tv-PB-120.

8.1.1. Приготовить необходимое число бесцветных пробирок вместимостью 0,2 мл, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

Маркировка пробирок на крышке возможна только для реал-тайм амплификатора Rotor Gene, для всех остальных амплификаторов маркировка пробирок на крышке недопустима! В таком случае пробирки следует расставить в соответствии с заранее подготовленной схемой.

8.1.2. Полностью разморозить компоненты из набора. Пробирки с реакционной смесью-PB и разбавителем тщательно перемешать.

8.1.3. Из компонентов набора приготовить смесь из расчета на 1 образец (табл.4):

Таблица 4

Компонент	Количество (мкл)
Разбавитель	21
Реакционная смесь-PB	7
Taq-полимераза	0,3

Рекомендуется готовить смесь реагентов не менее чем на 5 реакций. При приготовлении смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

8.1.4. Перемешать амплификационную смесь пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

8.1.5. Внести в приготовленные пробирки по 28 мкл полученной амплификационной смеси.

Перейти к пункту 8.4.

8.2. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения ДИПЛЕКС Ct+Tv TwoStep PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep PB-96.

8.2.1. Достать набор из холодильника, подготовить и пронумеровать необходимое количество пробирок с реакционной смесью PB-TS, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

8.2.2. Пробирку с Раствором Taq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

8.2.3. Добавить во все пробирки по 7 мкл Раствора Taq-полимеразы.

Перейти к пункту 8.4.

8.3. Подготовка к проведению амплификации, варианты исполнения ДИПЛЕКС Ct+Tv OneStep PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep PB-96

Данная комплектация не требует предварительной подготовки реагентов и представляет собой полностью готовую амплификационную смесь PB-OS, содержащую Taq-полимеразу и расфасованную в пробирки для проведения реакции.

8.3.1. Достать из коробки и промаркировать необходимое число пробирок, включая пробирки для ПКО ИППП и отрицательного контрольного образца.

8.3.2. Полностью разморозить содержимое пробирок.

При необходимости, если часть раствора находится на внутренней стороне крышки пробирки, отцентрифугировать пробирки 3-5 сек. на микроцентрифуге-вортексе.

8.4. Проведение амплификации, все комплектации.

8.4.1. В пробирки с амплификационной смесью добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 7 мкл:

- а) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;
- б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в) в пробирки положительного контрольного образца – ПКО ИППП.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

8.4.2. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

8.4.3. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующим программам (ниже представлены программы амплификации для комплектаций TwoStep для различных видов амплификаторов):

«CFX 96» (BioRad) «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research) «Rotor-Gene Q» (QIAGEN)	+80 °C	2 мин*	40 циклов
	+95 °C	1 мин 30 сек	
	+95 °C	15 сек	
	+60 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX)	
	+72 °C	40 сек	

«iCycler IQ5» (BioRad) ДТ-96 (ДНК-Технология)	+80 °C	2 мин*	40 циклов
	+94 °C	1 мин 30 сек	
	+94 °C	10 сек	
	+62 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX)	
	+72 °C	20 сек	

* - для комплектаций Нераскапанный и OneStep раздел программы +80 °C -2 мин необязателен.

Примечание . Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора. (www.lytech.ru)

9. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Детекция продуктов амплификации «в реальном времени» осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

9.2. При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации.

9.3. Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов ДИПЛЕКС St+Tv, представлены в таблице 5 на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» ДТ-96 (ДНК-технология, Россия).

Таблица 5

Флуорофор	Возбудитель	Пороговая линия	Конечный цикл (КЦ)
HEX	ДНК человека	20	35
FAM	<i>Chlamydia trachomatis</i>	100	35
ROX	<i>Trichomonas vaginalis</i>	20	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца (значение N/A) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла (КЦ). Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6

	Содержание ДНК возбудителя	Ct FAM, ROX	Ct HEX	Результат
ПКО ИППП		22-28	22-28	Реакция прошла
		НЗ или > КЦ	НЗ или > КЦ	Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
К-	НЗ или < чувствит	НЗ или > КЦ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	≥ чувствит.	< КЦ	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или < чувствит	НЗ или > КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ .
Исследуемый образец	≥ чувствит.	< КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.
	НЗ или < чувствит.	НЗ или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК соответствующего возбудителя.
	НЗ или < чувствит.	НЗ или > КЦ	> КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

9.4. Расчет концентрации ДНК в анализируемом образце.

Внимание! Надежными можно считать концентрации только тех образцов, значения Ct для которых лежат в указанном диапазоне линейности.

Рассчитать концентрацию ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* и – при необходимости – ДНК человека в образце по формуле:

$$C_{\text{Образца}} = C_{\text{ПКО}} * 2^{(Ct_{\text{ПКО}} - Ct_{\text{Образца}})}$$

$C_{\text{Образца}}$ – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце, выраженная в геном-эквивалентах/мл,

$C_{\text{ПКО}}$ – концентрация плазмиды, несущей специфический фрагмент ДНК соответствующего возбудителя (или человека), в ПКО, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору),

$Ct_{\text{Образца}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$Ct_{\text{ПКО}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции положительного контрольного образца с пороговой линией;

Концентрация ДНК возбудителя может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. При этом концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК Chl.tr.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000,$$

концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК Trich.vag.}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000$$

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК Chl.tr.}}$ - вычисленная концентрация ДНК *Chlamydia trachomatis* в образце

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК Trich.vag.}}$ - вычисленная концентрация ДНК *Trichomonas vaginalis* в образце

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}$ - вычисленная концентрация ДНК человека в образце.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Условия хранения.

Набор ДИПЛЕКС Ct+Tv-PB-120 должен храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 12 месяцев.

Набор ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-96, должен храниться при температуре плюс 2-8°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 9 месяцев.

Набор ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-96 должен храниться при температуре минус 18-20°C в течение всего срока годности. Срок годности комплектов – 4 месяца.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

10.2. Транспортирование.

Набор реагентов ДИПЛЕКС Ct+Tv транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и автомобильным транспортом, (условия транспортирования соответствуют условиям хранения) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств.

Для набора реагентов ДИПЛЕКС Ct+Tv-PB-120 допустима транспортировка при температуре от плюс 2 до 8 °C в течение 5 дней (не более).

Для набора реагентов ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-TwoStep-PB-96 допустима транспортировка при температуре от плюс 18 до 25 °C в течение 3 дней (не более).

Для набора реагентов ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-60, ДИПЛЕКС Ct+Tv-OneStep-PB-96 допустима транспортировка при температуре от плюс 2 до 8 °C в течение 1 суток (не более) либо в пенопластовых контейнерах с сухим льдом в течение 3 суток.

Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАБОРА.

Перед проведением анализов от пациентов при использовании новой серии набора реагентов **ДИПЛЕКС Ct+Tv** необходимо провести контроль качества работы набора.

11.1. Контроль внешнего вида компонентов.

Внешний вид компонентов набора должен соответствовать характеристикам, представленным в таблице 7.

11.2. Контроль аналитической чувствительности набора.

11.2.1. Образцы, необходимые для проведения контроля.

Для определения аналитической чувствительности следует приготовить три образца ОЧ (образец чувствительности).

Для приготовления ОЧ Ct (*Chlamydia trachomatis*) необходимо развести ПКО ИППП в разбавителе до концентрации $5 \cdot 10^2$ ГЭ/мл, исходя из концентрации указанной во вкладыше к набору.

Таблица 7.

№	Маркировка комплектаций	Состав	Внешний вид
1	ДИПЛЕКС Ct+Tv PB-120	1. Реакционная смесь PB 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. ПКО ИППП	Прозрачная жидкость розоватого цвета Прозрачная вязкая бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость
2	ДИПЛЕКС Ct+Tv OneStep-PB-60	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость
3	ДИПЛЕКС Ct+Tv OneStep-PB-96	1. Амплификационная смесь PB-OS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель	Прозрачная бесцветная жидкость под слоем вязкой прозрачной жидкости Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость
4	ДИПЛЕКС Ct+Tv TwoStep-PB-60	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная вязкая бесцветная жидкость
5	ДИПЛЕКС Ct+Tv TwoStep-PB-96	1. Реакционная смесь PB-TS 2. ПКО ИППП 3. Разбавитель 4. Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость под пробкой белого цвета Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная бесцветная жидкость Прозрачная вязкая бесцветная жидкость

Для приготовления ОЧ Tv (*Trichomonas vaginalis*) необходимо развести ПКО ИППП в разбавителе до концентрации $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, исходя из концентрации указанной во вкладыше к набору.

Для приготовления ОЧ ВК (Внутренний контроль, ДНК человека) необходимо развести ПКО ИППП в разбавителе до концентрации $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, исходя из концентрации указанной во вкладыше к набору.

При выполнении разведений необходимо соблюдать два правила:

- 1) не следует одновременно разводить образец более, чем в 10 раз,
- 2) объём отбираемой из образца аликвоты для разведения не должен быть меньше 5 мкл.

Например, для приготовления ОЧ Ct из ПКО с концентрацией $5 \cdot 10^5$ ГЭ/мл необходимо подготовить три пробирки вместимостью 0,5 мл, внести в них по 45 мкл разбавителя. Добавить в первую пробирку 5 мкл ПКО, перемешать 10 секунд на вортексе, центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель. Внести во вторую пробирку 5 мкл из первой пробирки, перемешать 10 секунд на вортексе, центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель. Внести в третью пробирку 5 мкл из второй пробирки, перемешать 10 секунд на вортексе, центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе для сброса капель. Содержимое третьей пробирки использовать в качестве матрицы для анализа.

11.2.2. Проведение анализа.

Провести ПЦР-амплификацию образцов ОЧ Ct, ОЧ Tv, ОЧ ВК и ПКО ИППП в соответствии с протоколом, описанным в разделе 8 данной инструкции для соответствующих вариантов исполнения набора.

11.2.3. Учет и анализ результатов провести в соответствии протоколом, представленным в пунктах 9 данной инструкции.

При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» аналитическая чувствительность считается подтвержденной, если результаты анализа соответствуют данным Таблицы 8.

Результат контроля. Во всех случаях несоответствия получаемых результатов данным Таблицы 8 реагенты признаются непригодными к использованию. При этом осуществляется их полная замена и повторное исследование контрольных образцов до получения положительного результата контрольных испытаний.

Таблица 8.

	Ct FAM (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	Ct ROX (<i>Trichomonas vaginalis</i>)	Ct HEX (ДНК человека)
ПКО ИППП	значение Ct должно определяться в диапазоне значений, указанном во вкладыше к набору реагентов (22-28)		
К-	НД или > КЦ	НД или > КЦ	НД или > КЦ
ОЧ Ct	<КЦ	любой	любой
ОЧ Tv	любой	<КЦ	любой
ОЧ ВК	любой	любой	<КЦ

12. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение неиспользованных компонентов набора или наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-8.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают раздавливанием внутренней упаковки с последующим разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор. Твердые компоненты подлежат дроблению, последующему разведению водой в соотношении 1:100, сливом раствора в промышленную канализацию и вывозом остатков упаковок как производственного или бытового мусора. Компоненты изделий, нерастворимые в воде, уничтожают путем сжигания.

13. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора **ДИПЛЕКС Ct+Tv**, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

Рук. производственного отдела
ООО НПФ «Литех»

С.Г.Байцур

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К.Варнавичус



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 14 ЛИСТОВ

«09» 12 2016 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.



Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов 14 шт.

Директор Наумов А.Ю.

