



УТВЕРЖДАЮ
Руководитель отдела сертификации
ООО «ТестГен»
Л. М. Халилова
«02» июня 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**Набор реагентов для качественного определения ДНК
Helicobacter pylori в клиническом материале человека
методом полимеразной цепной реакции с детекцией в
режиме реального времени «НР-тест»
по ТУ 21.20.23-059-97638376-2022**

Содержание

Список сокращений.....	3
Введение	4
1. Назначение	6
2. Принцип метода.....	6
3. Состав набора реагентов	9
4. Характеристики набора реагентов	10
5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов.....	19
6. Меры предосторожности при работе с набором	19
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов	22
8. Анализируемые образцы.....	24
9. Подготовка компонентов набора для исследования	28
10. Проведение анализа.....	29
11. Регистрация и интерпретация результатов	31
Рекомендации по установке пороговой линии	31
12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов.....	33
13. Утилизация.....	34
14. Гарантийные обязательства, контакты	35
Приложение А.....	36
Приложение Б	37

Список сокращений

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ВКО	внутренний контрольный образец
КОС	контрольный образец специфичности
КОЧ	контрольный образец чувствительности
СОЖ	слизистая оболочка желудка
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт

Введение

Целевой анализ: специфичный участок геномной ДНК *Helicobacter pylori*.

Научная обоснованность целевого анализа заключается в специфичности (уникальности последовательности ДНК) в отношении генома бактерии *Helicobacter pylori*.

H. pylori передается от человека к человеку, чаще всего в детском возрасте, и вызывает хронический активный гастрит у всех инфицированных.¹ Основной путь передачи – внутрисемейный. Возбудитель передается преимущественно фекально-оральным путем.

Инфекция *H. pylori* является одним из ведущих этиологических факторов заболеваний верхних отделов желудочно-кишечного тракта, таких как хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, MALT-лимфома и аденокарцинома желудка². Имеются данные, связывающие *H. pylori* с развитием необъяснимой железодефицитной анемии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры и дефицитом витамина B12³.

Инфекция *H. pylori* ассоциирована с повышением риска возникновения гастропатии у пациентов, принимающих нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и низкие дозы ацетилсалициловой кислоты (АСК). Диагностика *H. pylori* обязательна перед плановым назначением НПВП и АСК⁴.

¹ Бордин Д. С., Шенгелия М. И., Иванова В. А. и др. *Helicobacter pylori*, клиническое значение и принципы диагностики // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение – 2022, №1(40).

² Маев И.В., Мкртумян А.М., Бектемирова Л.Г. и др. Эффективность радикационной терапии 1-й линии инфекции *Helicobacter pylori* у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа // Терапевтический архив – 2022, №94(2), с. 209–215.

³ Шептулин А.А. Основные положения согласительного совещания «Маастрихт-VI» (2022) по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии – 2022, №32(5), с.70-74.

⁴ Лазебник Л.Б., Бордин Д.С., Дехнич Н.Н. и др. VII Национальные рекомендации по диагностике и лечению заболеваний, ассоциированных с *Helicobacter pylori* (VII Московские соглашения) – 2021.

Область применения набора реагентов – клиническая лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.

Показания к применению: набор реагентов рекомендуется использовать в клинической лабораторной диагностике для исследования клинического материала (биоптаты СОЖ и двенадцатиперстной кишки, фекалии, слюна) у пациентов с подозрением на хеликобактериоз вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения.

Противопоказания к применению: при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению не выявлены.

Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия: популяционных, демографических аспектов применения набора реагентов не выявлено.

Стерильность: изделие не стерильно.

1. Назначение

Назначение: набор реагентов предназначен для качественного определения ДНК *Helicobacter pylori* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени в пробе ДНК, выделенной из клинического материала (биоптаты СОЖ и двенадцатиперстной кишки, фекалии, слюна), у пациентов с подозрением на хеликобактериоз и ассоциированные заболевания органов ЖКТ.

Функциональное назначение – полученные результаты могут использоваться для ранней диагностики хеликобактериозной инфекции у пациентов с подозрением на хеликобактериоз и ассоциированные заболевания органов ЖКТ вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения. Результаты учитываются в комплексной диагностике заболевания.

Потенциальные потребители медицинского изделия

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинко-диагностических лабораториях. Профессиональный уровень потенциальных пользователей – врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник.

2. Принцип метода

Метод

Качественная ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенной из биоптатов СОЖ и двенадцатиперстной кишки, фекалий и слюны.

Принцип определения

Процесс амплификации ДНК происходит в реакционном буфере при помощи специфичных к соответствующим участкам ДНК праймеров и фермента *Taq*-полимеразы и заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК и отжига праймеров с их последующей элонгацией.

В составе ПЦР-смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени и

разрушаются *Taq*-полимеразой, в результате чего разобщаются краситель и тушитель, и происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени». В смеси содержится также фермент урацил-ДНК-гликозилаза, препятствующий контаминации реакционной смеси ампликонами.

Набор содержит реагенты для определения высокоспецифичных участков ДНК *Helicobacter pylori*, а также ВКО (табл. 1).

Таблица 1 – Анализируемые мишени

Канал, соответствующий флуорофору	
FAM/Green	HEX/Yellow
<i>Helicobacter pylori</i>	ВКО

ВКО позволяет оценить эффективность выделения ДНК и возможного наличия ингибиторов в пробе, присутствие которых может привести к ложноотрицательным результатам.

Ограничения метода

При проведении исследования слюны

Исследование рекомендуется проводить до приема антибактериальных средств и местных антисептических средств, так как прием антибиотиков незадолго до обследования может исказить результат.

При контроле лечения целесообразно проводить исследование слюны не ранее, чем через 10-14 дней после окончания применения соответствующих препаратов локального действия и не ранее, чем через один месяц после проведения системной терапии.

При подготовке пациента к процедуре следует учесть:

- за 6 часов до взятия образца слюны не рекомендуется использовать лекарственные средства для орошения ротоглотки и препараты для рассасывания;
- перед взятием образца слюны не чистить зубы, не использовать жевательную резинку/пастилки для освежения дыхания;

• перед взятием образца слюны прополоскать полость рта физиологическим раствором или водой комнатной температуры.

При проведении исследования фекалий

Используют пробы фекалий массой (объемом) примерно 1-3 г (1-3 мл). Исследование мазков неинформативно из-за низкого содержания в них возбудителей. Пробу в количестве 1 г (примерно) отдельным наконечником с фильтром, или одноразовыми лопатками, или стерильным ватным тампоном переносят в специальный стерильный флакон.

Требуется предварительная обработка проб (см. п. 8.2 Инструкции).

При контроле лечения взятие биоматериала (кал) на исследование проводят не ранее 2-4 недель после завершения эрадикационной терапии.

При проведении исследования биоптатов СОЖ и двенадцатиперстной кишки

Взятие материала проводится врачом при гастродуоденоскопии. Подготовка к исследованию:

- последний прием пищи накануне вечером не позднее 18-20 часов.
- утром до процедуры не принимать пищи, воды, лекарств, не курить, не чистить зубы.

Возможная причина получения ложноположительного результата – контаминация на этапе выделения ДНК или проведения реакции ПЦР. Ложноположительный результат может быть выявлен с помощью отрицательного контрольного образца.

Набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит.

Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, или внешний вид реагента не соответствует описанию.

Набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах исследования с использованием данного МИ. В диагностических целях результаты должны использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования других тест-систем, применяемой терапией.

Общее время проведения анализа составляет 65 минут (без учета пробоподготовки).

3. Состав набора реагентов

Форма комплектации

Набор реагентов выпускается в одной форме комплектации.

Количество анализируемых проб

Каждый набор содержит реагенты, рассчитанные на проведение 96 реакций, что соответствует:

- определению 94 исследуемых образцов, отрицательного и положительного контрольных образцов при массовых исследованиях или 32 единичным постановкам исследуемых образцов с отрицательными и положительными контрольными образцами в каждой постановке.

Состав набора реагентов

Таблица 2 – Состав набора реагентов

№ пп	Название реагента	Описание	Количество, объем
1	ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
2	Праймер-микс	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета	1 пробирка, 480 мкл
3	ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 480 мкл
4	ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка, 950 мкл
5	ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки по 1800 мкл

ПЦР-буфер готов к использованию и содержит все основные реагенты, включая термостабильную ДНК-полимеразу с «горячим стартом», дезоксинуклеотидтрифосфаты (дНТФ), урацил-ДНК-гликозилазу и оптимизированный для ПЦР буфер.

Праймер-микс готов к использованию и содержит мультиплексную смесь праймеров и зондов:

1. праймеры и зонд к специфичному участку геномной ДНК бактерии *Helicobacter pylori* (FAM/Green);
2. праймеры и зонд к ВКО (HEX/Yellow).

Положительный контрольный образец (ПКО) готов к использованию и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: специфичные фрагменты генома бактерии *Helicobacter pylori* и ВКО. ПКО не проходит этап выделения НК.

Внутренний контрольный образец (ВКО) готов к использованию и представляет собой плазмидную ДНК с синтетической вставкой специфичного амплифицируемого фрагмента ДНК бактерии *Helicobacter pylori*. ВКО в объеме 10 мкл добавляется к каждому исследуемому образцу и ОКО после этапа пробоподготовки и перед выделением НК.

Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к использованию и представляет собой деионизованную воду, свободную от ДНКаз. ОКО проходит этап выделения НК с добавлением ВКО.

В составе набора отсутствуют лекарственные средства для медицинского применения, вещества человеческого или животного происхождения.

4. Характеристики набора реагентов

4.1. Технические и функциональные характеристики

Таблица 3 – Набор реагентов «НР-тест»

Наименование показателя	Характеристики и нормы
1. Технические характеристики	
1.1. Внешний вид	
ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость
Праймер-микс	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета
ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость
1.2. Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-059-97638376-2022
1.3. Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-059-97638376-2022
1.4. Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-059-97638376-2022
2. Функциональные характеристики	
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналам FAM и HEX Ct ≤ 32

Прохождение реакции в образце ОКО+ВКО	В образце ОКО+ВКО по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), по каналу HEX Ct ≤ 32 .
Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналу FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует) или Ct > 35
Прохождение реакции в образце КОЧ+ВКО	В образце КОЧ+ВКО по каналу FAM во всех повторях (не менее 4) Ct ≤ 35 , а по каналу HEX Ct ≤ 32 .

В случае неисправности медицинского изделия, отклонений в его функционировании, которые могут влиять на безопасность, изменений аналитических характеристик изделия незамедлительно прекратить применение медицинского изделия и сообщить производителю (см. раздел 14).

4.2. Характеристики аналитической эффективности

4.2.1. Аналитическая специфичность

Специфичен по отношению к ДНК *Helicobacter pylori*.
по результатам оценки перекрестной реактивности, проведенной при исследовании НК штаммов следующих микроорганизмов:

Коллекция федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»): *Salmonella enteritidis* S-6, *Salmonella choleraesuis* 370, *Pseudomonas aeruginosa* ДН c1, *Salmonella typhimurium* 371, *Salmonella dublin* 373, *Salmonella typhi* C1, *Staphylococcus aureus* 653, *Salmonella abortusovis* 372, *Salmonella gallinarum-pullorum*, *Shigella flexneri* 851b, *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* 43435, *Campylobacter fetus subsp. fetus* 25936, *Listeria monocytogenes* УСХЧ 19, *Listeria monocytogenes* УСХЧ 52, *Proteus vulgaris* 115/98, *Morganella Morganii* 619 c 01

неспецифических реакций выявлено не было.

4.2.2. Оценка влияния потенциально интерферирующих веществ

Влияние потенциально интерферирующих веществ на работу набора реагентов было проверено в отношении потенциально интерферирующих веществ, которые могут встречаться при

нормальном использовании набора реагентов, и, предположительно, влиять на способность набора реагентов выдавать достоверные результаты.

Интерферирующие вещества могут происходить от следующих внешних и внутренних источников:

1) вещества, используемые при лечении пациента (например, лекарственные средства);

2) вещества, встречающиеся в конкретных видах образцов (например, гемоглобин крови);

Исследованные концентрации интерферирующих веществ, которые приведены в таблице 4.

Таблица 4

Интерферирующие вещества	Максимальная концентрация
Эндогенные интерферирующие вещества	
Гемоглобин	260 мкг/мл
Экзогенные интерферирующие вещества	
<i>Препараты, назначаемые при антихеликобактерной терапии</i>	
Пантопразол	0,008 мг
Эзомепразол	0,008 мг
Омепразол	0,004 мг
Кларитромицин	0,1 мг
Амоксициллин	0,1 мг
Метронидазол	10 мг
Де-Нол	0,06 мг

По результатам серии ПЦР-реакций с контрольными образцами, к которым интерферирующее вещество не было добавлено, и контрольных образцов с добавлением потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, которые, как ожидается, будут встречаться при нормальном использовании набора реагентов «НР-тест», исследованные потенциально интерферирующие вещества не оказывают интерферирующего влияния на работу набора и не приводят к ингибированию ПЦР при концентрациях, не превышающих допустимые.

Ограничения по использованию анализируемого материала:

- анализируемый материал не подлежит использованию при нарушении условий хранения и транспортировки (температура, продолжительность, многократное замораживание-оттаивание);

- не допускается использование образцов, загрязненных посторонним биологическим материалом.

- **для образцов слюны:** исследование рекомендуется проводить до приема антибактериальных средств и местных антисептических средств, так как прием антибиотиков незадолго до обследования может исказить результат.

При контроле лечения целесообразно проводить исследование слюны не ранее, чем через 10-14 дней после окончания применения соответствующих препаратов локального действия и не ранее, чем через один месяц после проведения системной терапии.

При подготовке пациента к процедуре следует учесть:

- за 6 часов до взятия образца слюны не рекомендуется использовать лекарственные средства для орошения ротоглотки и препараты для рассасывания;

- перед взятием образца слюны не чистить зубы, не использовать жевательную резинку/пастилки для освежения дыхания;

- перед взятием образца слюны прополоскать полость рта физиологическим раствором или водой комнатной температуры.

- **для образцов фекалий:** используют пробы фекалий массой (объемом) примерно 1-3 г (1-3 мл). Исследование мазков неинформативно из-за низкого содержания в них возбудителей. Пробу в количестве 1 г (примерно) отдельным наконечником с фильтром, или одноразовыми лопатками, или стерильным ватным тампоном переносят в специальный стерильный флакон.

Требуется предварительная обработка проб (см. п. 8.2 Инструкции).

При контроле лечения взятие биоматериала (кал) на исследование проводят не ранее 2-4 недель после завершения эрадикационной терапии.

- **для образцов биоптатов СОЖ и двенадцатиперстной кишки:** взятие материала проводится врачом при гастродуоденоскопии. Подготовка к исследованию:

- последний прием пищи накануне вечером не позднее 18-20 часов.

- утром до процедуры не принимать пищи, воды, лекарств, не курить, не чистить зубы.

4.2.3 Предел обнаружения

В соответствии ГОСТ Р 51352-2013 и с учетом международных рекомендаций CLSI EP-17A2 предел обнаружения (LOD) определяли методом анализа разведений стандартного образца предприятия СОП-*Helicobacter pylori*, представляющий собой плазмиду с синтетической вставкой фрагмента геномной ДНК *Helicobacter pylori* с концентрацией 1000 копий в 1 мл 10 % ТЕ-буфере (10 mM Трис, 1 mM ЭДТА), в деионизованной воде в диапазоне предполагаемого предела обнаружения – 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 копий/мл.

По результатам исследования предел обнаружения ДНК *Helicobacter pylori* в образцах объемом 100 мкл с частотой выявления 95 % при использовании наборов для выделения «ДНК-сорб-В» (РУ № ФСР 2009/05220 от 05.03.2019 г.) и «Проба-НК» (РУ № ФСР 2010/08867 от 13.10.2016 г.) для каждого амплификатора составляет:

Используемый амплификатор	Концентрация, копий/мл (LOD) с доверительной вероятностью 95%	Доверительный интервал с доверительной вероятностью 95%
«ДНК-сорб-В»		
ДТпрайм	448	394,32-501,68
CFX 96	453	399,32-506,68
Rotor-Gene Q	456	402,32-509,68
Quant Studio 5	449	395,32-502,68
FLUORITE	467	413,32-520,68
«Проба-НК»		
ДТпрайм	463	409,32-516,68
CFX 96	454	400,32-507,68
Rotor-Gene Q	464	410,32-517,68
Quant Studio 5	439	385,32-492,68
FLUORITE	454	400,32-507,68

4.2.4 Метрологическая прослеживаемость

Метрологическая прослеживаемость контрольных образцов – положительного контрольного образца (ПКО), отрицательного контрольного образца (ОКО+ВКО), контрольного образца для определения чувствительности (КОЧ+ВКО), контрольного образца специфичности (КОС), стандартного образца предприятия (СОП-*Helicobacter pylori* +ВКО) подтверждена спектрофотометрическим методом, путем проведения проверки концентрации стокового раствора U-937 (производства «Thermo Fisher Scientific», США), входящего в состав КОС, и плазмид pl. *Escherichia phage* MS2 и pl. *Helicobacter pylori* с последующим проведением мультиплексной аллель-специфической ПЦР-РВ.

Полученные результаты подтвердили, что положительный контрольный образец (ПКО) обеспечивает стабильную работу набора реагентов «НР-тест» и представляет собой смесь плазмидных ДНК с синтетическими вставками амплифицируемых фрагментов ДНК: специфичный фрагмент ДНК *Helicobacter pylori* и *Escherichia phage* MS2. ПКО находится в 10% ТЕ-буфере (1 мМ Трис, 0,1 мМ ЭДТА) с азидом натрия 0,05% с концентрацией 3 900 000 коп/мл и 2 700 000 коп/мл соответственно.

Неопределенность приписанных концентраций контрольных образцов может рассматриваться как погрешность результатов измерений, полученных спектрофотометрически с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (референтный метод), которая составляет $\pm 1\%$.

Полученные результаты подтвердили, что отрицательный контрольный образец (ОКО) обеспечивает стабильную работу Набора реагентов «НР-тест», позволяет проконтролировать отсутствие ложноположительных результатов, начиная с этапа пробоподготовки, и не содержит ДНК.

Полученные результаты ПЦР-исследования подтвердили корректную работу контрольных образцов: контрольного образца для определения чувствительности (КОЧ+ВКО), контрольного образца специфичности (КОС), стандартного образца предприятия (СОП-*Helicobacter pylori* +ВКО) и возможность их использования для контроля функциональных характеристик готовой продукции при проведении прямо-сдаточных испытаний.

4.2.5 Прецизионность в условиях повторяемости

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости положительный контрольный образец, контрольный образец чувствительности (КОЧ) и специфичности (КОС), СОП-*Helicobacter pylori*, образце ОКО+ВКО были исследованы по 10 повторов.

Данные по повторяемости получают внутри лаборатории для конкретного оборудования и внутри конкретной партии набора реагентов.

Для оценки прецизионности в условиях повторяемости рассчитывают среднее арифметическое выборки, дисперсию, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации по полученным значениям в повторах контрольных образцов.

Результаты исследования показали, что коэффициент вариации в условиях повторяемости набора составляет не более 3%

4.2.6 Прецизионность в условиях воспроизводимости

Оценку воспроизводимости тест-системы проводят аналогично расчету прецизионности в условиях повторяемости (раздел 4.2.5), однако для тестирования используют различные партии набора реагентов, реакции ставят в разных лабораториях, разные операторы, в разные дни, на разных ПЦР-амплификаторах (Блок воспроизводимости 1, Блок воспроизводимости 2, Блок воспроизводимости 3, Блок воспроизводимости 4).

При проведении прецизионности в условиях воспроизводимости наблюдалась полная внутривыставочная, межвыставочная и межсерийная воспроизводимость, коэффициент вариации не превышает 5%.

4.3. Характеристики клинической эффективности

Для проведения клинических испытаний было отобрано 178 образцов клинического материала (41 - биоптатов СОЖ, 40 - биоптатов двенадцатиперстной кишки, 43 – фекалий, 54 - слюны), полученного от 84 пациентов в возрасте от 4 лет до 83 лет с подозрением на хеликабактериоз и ассоциированные заболевания органов ЖКТ.

В соответствии с рекомендациями Международного руководства CLSI EP09-A3 клинические исследования рекомендуется проводить не менее чем на 40 клинических образцах. С целью проведения исследований с использованием клинического материала

на большем объеме выборки, в соответствии с рекомендациями CLSI EP09-A3, каждый образец был протестирован в 2 повторах начиная с процедуры проведения выделения ДНК.

Каждый исследуемый клинический образец был протестирован в двух сериях с помощью исследуемого набора реагентов «НР-тест» и полученные данные сравнивались с результатами, полученными:

- для образцов биоптатов СОЖ, двенадцатиперстной кишки и фекалий с помощью зарегистрированного медицинского изделия «Набор реагентов для выявления ДНК *Helicobacter pylori* методом полимеразной цепной реакции (*Helicobacter pylori*) по ТУ 21.20.23-042-46482062-2019», производства ООО "ДНК-Технология ТС", Россия, регистрационное удостоверение № РЗН 2020/12859 от 09.12.2020;

- для образцов слюны методом секвенирования с парой олигонуклеотидных праймеров, специфичных для консервативных участков гена 16S рРНК на секвенаторе Applied Biosystems 3500 Dx («Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09862 от 24 марта 2022 года) с использованием чипа 318v2. Биоинформатическая обработка проведена с помощью пакета QIIME.

Свидетельством правильности работы исследуемого медицинского изделия было совпадение результатов.

Для проведения ПЦР-исследования набором реагентов «НР-тест» использовали амплификаторы, рекомендуемые производителем исследуемого набора реагентов:

- CFX96 (BioRad, США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016),
- ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСЗ 2011/10229 от 03.03.2011),

- Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010),

- QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019),

- FLUORITE (Xian TianLong Science and Technology Co, Китай, РУ № РЗН 2022/16415 от 24.01.2022).

Воспроизводимость результатов для всех использованных амплификаторов 100%.

При тестировании 84 пациентов в возрасте от 4 лет до 83 лет с подозрением на хеликабактериоз и ассоциированные заболевания органов ЖКТ, из пула образцов, поступающих на тестирование в

ФГБОУ ВО Сам ГМУ Минздрава России, а также из банка остаточных аликвот клинического материала, сформированного ФГБОУ ВО Сам ГМУ Минздрава России (41 – биоптат СОЖ, 40 – биоптат 12-перстной кишки, 43 – слюна, 54 – фекалии), испытываемым набором реагентов «НР-тест» в двух сериях было определено, что:

- 20 образцов биоптатов СОЖ являются истинноположительными, 21 образец – истинноотрицательным,

- 20 образцов биоптатов 12-перстной кишки являются истинноположительными, 20 образцов – истинноотрицательными,

- 26 образцов фекалий являются истинноположительными, 26 образцов – истинноотрицательными, 2 образца – ложноотрицательных,

- 18 образцов слюны являются истинноположительными, 21 образец – истинноотрицательным, 4 образца – ложноотрицательными.

Доверительные интервалы (ДИ) диагностических характеристик будут рассчитаны по методу Клоппера и Пирсона (Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper, C., & Pearson, E. (1934). The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. *Biometrika*, 26(4), 404-413. doi:10.2307/2331986). Диагностические характеристики испытываемого набора были рассчитаны с доверительной вероятностью 95 %.

Вид исследуемого материала	Количество наблюдений с положительными пробами	Количество наблюдений с отрицательными пробами	Диагностическая чувствительность с доверительной вероятностью 95 %	Диагностическая специфичность с доверительной вероятностью 95 %
Биоптаты СОЖ	40	42	100% (95% ДИ: 91,19%-100%)	100% (95% ДИ: 91,59%-100%)
Биоптаты 12-перстной кишки	40	40	100% (95% ДИ: 91,19%-100%)	100% (95% ДИ: 91,19%-100%)
Фекалии	56	52	92,86% (95% ДИ: 82,71%-98,02%)	100% (95% ДИ: 93,15%-100%)
Слюна	44	42	81,82% (95% ДИ: 67,29%-91,81%)	100% (95% ДИ: 91,59%-100%)

5. Перечень рисков, связанных с применением набора реагентов

В пограничную зону риска вошли опасности:

1. Потеря функциональных свойств реагентов, входящих в набор, из-за транспортирования, хранения или эксплуатации в несоответствующих условиях;
2. Загрязнение клинического материала ингибирующими веществами в концентрациях, превышающих допустимые;
3. Контаминация реакционных смесей и образцов исследуемой ДНК содержимым из пробирки ПКО или продуктами амплификации;
4. Проведение анализа с использованием пробы ДНК низкого качества (низкая концентрация и/или плохая очистка);
5. Невыполнение требований по пробоподготовке, проведению анализов и утилизации вследствие работы с набором неквалифицированного персонала;
6. Использование непригодного для применения набора (использование по истечении срока годности или при нарушении упаковки).

В области недопустимой зоны риски не выявлены.

Совокупный остаточный риск применения медицинского изделия является допустимым, польза от его применения превышает риск.

6. Меры предосторожности при работе с набором

Класс в зависимости от потенциального риска применения – 2б – в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий, утверждаемой приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.06.2012 N 4н.

Все составные части и реагенты, входящие в состав набора реагентов, относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

Реагенты, входящие в набор «ИР-тест», обладают низкой упругостью пара и исключают возможность ингаляционного отравления.

Реагенты, входящие в набор, не токсичны, поскольку готовятся путем смешивания отдельных нетоксичных компонентов.

Работу с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность, проводят в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Необходимо одновременно обеспечить и соблюдать персоналом правила биологической безопасности и требования к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами и (или) ампликонами исследуемых проб помещений и оборудования.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением санитарно-эпидемических правил СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». Необходимо следовать рекомендациям, изложенным в МУ 287-113, МУ 1.3.2569-09.

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

– удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 от 28.01.2021 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»;

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.

– применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции;

- допускать к работе с набором только специально обученный персонал (специалист с высшим медицинским или биологическим образованием, прошедший обучение на лицензированных курсах специализации по работе с ПБА III-IV групп патогенности и по ПЦР-диагностике, а также лаборант со средним специальным медицинским образованием);
- не использовать набор по истечении срока годности;
- избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором реагентов

Работа с набором реагентов осуществляется в рабочей зоне 3 (для приготовления реакционных смесей) (МУ 1.3.2569-09).

Оборудование для проведения ПЦР:

1. Бокс биологической безопасности II и III класса защиты (например, Боксы микробиологической безопасности БМБ-II- "Ламинар-С" по ТУ 32.50.50-010-51495026-2020, производства ЗАО "Ламинарные системы", РУ № ФСР 2012/13259 от 29.07.2021 или Бокс для стерильных работ DNA/RNA UV-Cleaner Box UVC/T-M-AR, Biosan, Латвия, РУ № РЗН 2023/19369 от 18.01.2023);

2. Вортекс (например, Высокоскоростная мини-центрифуга Microspin 12, BIOSAN SIA, Латвия, РУ № ФСЗ 2011/10116 от 11.07.2011 или центрифуга-встряхиватель CM-70M, производства SIA "ELMI", Латвия, РУ № РЗН 2016/4616 от 31.05.2023);

3. Дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объёмы жидкости 0,5–10 мкл, 10–100 мкл или 20–200 мкл, 100–1000 мкл (например, Eppendorf Research Plus, Германия, РУ № ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011 или «Biohit», Финляндия, РУ № ФСЗ 2012/12201 от 18.05.2012);

4. Холодильник от +2 °С до +8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С (например, Холодильник комбинированный лабораторный ХЛ-250 "POZIS", ХЛ-250-1 "POZIS" по ТУ 9452-203-07503307-2012, производства АО "ПОЗИС", РУ № РЗН 2016/4043 от 08.05.2019);

5. Амплификатор⁵ с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени по каналам, соответствующим флуорофорам FAM/Green, HEX/Yellow:

- CFX96 (BioRad, США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016),

- ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229 от 03.03.2011),

- Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия, РУ № ФСЗ 2010/07595 от 10.08.2010),

⁵ Амплификаторы должны обслуживаться, калиброваться и использоваться в соответствии с рекомендациями производителя. Использование данного набора в неоткалиброванном приборе может оказать влияние на рабочие характеристики набора реагентов.

- QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США, РУ № РЗН 2019/8446 от 06.06.2019),

- FLUORITE (Xian TianLong Science and Technology Co, Китай, РУ №РЗН 2022/16415 от 24.01.2022).

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free».

1. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 1000 мкл, 200 мкл, 20 мкл и 10 мкл («Ахуген», США, РУ № ФСЗ 2012/12077 от 27.02.2014);

2. Одноразовые пробирки типа Эппендорф на 1,5–2,0 мл («Ахуген», США, РУ № ФСЗ 2012/11892 от 26.08.2014);

3. Тонкостенные одноразовые пробирки с оптически прозрачной крышкой для ПЦР («Ахуген», США, РУ № ФСЗ 2012/11892 от 26.08.2014):

- пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл,
- пробирки для ПЦР объемом 0,1–0,2 мл в стрипах,
- планшеты для ПЦР с оптически прозрачной пленкой.

4. Отдельный халат и одноразовые перчатки без талька;

5. Емкость с дезинфицирующим раствором;

6. Штативы «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл («Ахуген», США, РУ № ФСЗ 2012/11892 от 26.08.2014);

7. При исследовании фекалий для приготовления фекальной суспензии необходимо использование фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида).

8. При исследовании фекалий при необходимости длительного хранения фекальной суспензии необходимо использование глицерина в конечной концентрации 10–15%.

9. Полученные при эндоскопии биоптаты (кусочки ткани массой ~0,1–1,0 г) помещают в стерильные пробирки объемом 1,5–2,0 мл с транспортной средой (ТЕ-буфер, изотонический раствор хлорида натрия, фосфатный буфер).

10. Набор для выделения ДНК из клинического материала (см. п. 8.4 Инструкции).

8. Анализируемые образцы

Тип анализируемого образца

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, выделенной из биоптатов слизистой оболочки желудка (СОЖ) или двенадцатиперстной кишки, фекалий и слюны.

Перед добавлением ВКО к исследуемым образцам в ходе выделения ДНК, следует тщательно перемешать содержимое, переворачивая пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3–5 сек., а затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием.

Забор материала на исследование

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012.

Забор клинического материала и его упаковку осуществляет работник медицинской организации, обученный требованиям и правилам биологической безопасности при работе и сборе материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами III группы патогенности.

8.1. Процедура получения и пробоподготовки биоптатов

Взятие материала проводится врачом при гастродуоденоскопии. Подготовка к исследованию:

- последний прием пищи накануне вечером не позднее 18–20 часов.
- утром до процедуры не принимать пищи, воды, лекарств, не курить, не чистить зубы.

Полученные при эндоскопии биоптаты (кусочки ткани массой ~0,1–1,0 г) помещают в стерильные пробирки объемом 1,5–2,0 мл с транспортной средой (ТЕ-буфер, изотонический раствор хлорида натрия, фосфатный буфер).

ВНИМАНИЕ! Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения материала:

Допускается транспортирование и хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С не более 24 ч. В случае невозможности

доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение одного месяца.

8.2. Процедура получения и пробоподготовки фекалий

Используют пробы фекалий массой (объемом) примерно 1-3 г (1-3 мл). Исследование мазков неинформативно из-за низкого содержания в них возбудителей. Пробу в количестве 1 г (примерно) отдельным наконечником с фильтром, или одноразовыми лопатками, или стерильным ватным тампоном переносят в специальный стерильный флакон.

При контроле лечения взятие биоматериала (кал) на исследование проводят не ранее 2-4 недель после завершения эрадикационной терапии.

Требуется предварительная обработка проб!
При исследовании нативных фекалий без предшествующего замораживания готовят фекальную суспензию (при водянистой консистенции фекалий суспензию не готовят).

Приготовление фекальной суспензии

В соответствующее пробам количество микроцентрифужных пробирок, объемом 1,5–2,0 мл, вносят 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида). В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками, или стерильным ватным тампоном) вносят 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии.

При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к 10-20%-ной суспензии фекалий в фосфатном буфере (или стерильном изотоническом растворе натрия хлорида) добавляют глицерин в конечной концентрации 10-15%. Подготовленные таким образом пробы замораживают только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30-40 минут.

Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб

Образцы нативных фекалий:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;

- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток.

Фекальная суспензия с глицерином, бактериальная фракция и осветленный фекальный экстракт:

- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;

- при температуре минус 70 °С – длительно.

8.3. Процедура получения и пробоподготовки слюны

Исследование рекомендуется проводить до приема антибактериальных средств и местных антисептических средств, так как прием антибиотиков незадолго до обследования может исказить результат.

При контроле лечения целесообразно проводить исследование слюны не ранее, чем через 10-14 дней после окончания применения соответствующих препаратов локального действия и не ранее, чем через один месяц после проведения системной терапии.

При подготовке пациента к процедуре следует учесть:

- за 6 часов до взятия образца слюны не рекомендуется использовать лекарственные средства для орошения ротоглотки и препараты для рассасывания;
- перед взятием образца слюны не чистить зубы, не использовать жевательную резинку/пастилки для освежения дыхания;
- перед взятием образца слюны прополоскать полость рта физиологическим раствором или водой комнатной температуры.

Слюну забирают в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые стерильные пластиковые пробирки объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

ВНИМАНИЕ! Предварительная обработка проб не требуется.

Условия хранения материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;

- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 1 суток;

- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;

- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

8.4. Процедура выделения ДНК из биологического материала

Для выделения пробы геномной ДНК человека из биологического материала рекомендуется использование следующих комплектов реагентов:

- при использовании в качестве клинического материала биоптатов слизистой оболочки желудка (СОЖ) или двенадцатиперстной кишки:

- Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» по ТУ 9398-003-01897593-2009 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, РУ № ФСР 2009/05220 от 05.03.2019 г.);

- при использовании в качестве клинического материала слюны или фекалий:

- Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» по ТУ 9398-003-01897593-2009 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, РУ № ФСР 2009/05220 от 05.03.2019 г.);

- Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «ПРОБА-НК» по ТУ 9398-035-46482062-2009 производства ООО «ДНК-технология» (регистрационное удостоверение № ФСР 2010/08867 от 13.10.2016 г.).

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из исследуемых клинических образцов необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (ОКО) в объеме 100 мкл с добавлением 10 мкл ВКО, входящего в состав набора реагентов. Перед выделением ДНК из исследуемых образцов и ОКО, следует тщательно перемешать содержимое пробирки с ВКО, переворачивая пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек., а затем осадить капли с крышки пробирки коротким центрифугированием.

Условия возможного хранения анализируемых образцов ДНК:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более суток (24 ч);
- при температуре от минус 18 °С до минус 22°С – не более месяца;
- при температуре минус 80°С – длительно.

9. Подготовка компонентов набора для исследования

Установка, монтаж, настройка, калибровка медицинского изделия для ввода в эксплуатацию не требуется.

ВНИМАНИЕ! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «DNase-free». Обязательно использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером для каждого компонента реакции.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать согласно таблице 5 в ПЦР-пробирках перед проведением анализа.

Подготовка к исследованию

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок с выделенной для анализа ДНК, ОКО, прошедших этап выделения ДНК, Праймер-микс, ПЦР-буфер, ПКО, переворачивая каждую пробирку 10 раз или перемешивая на вортексе на низкой скорости в течение 3-5 сек., а затем осадить капли с крышек пробирок коротким центрифугированием;

2. Отобрать необходимое количество стрипов или пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК.

Перед проведением ПЦР необходимо произвести влажную уборку ПЦР-бокса, а также оборудования и материалов, находящихся в нем с применением дезинфицирующих средств, пригодных для использования в ПЦР-лабораториях, включить УФ-лампу на 20-30 минут.

10. Проведение анализа

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- 1. Подготовка ПЦР;
- 2. Амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени;
- 3. Интерпретация результатов (подробно описано в главе 11).

А) Подготовка ПЦР

(производится в ЗОНЕ пре-ПЦР – помещении для раскатывания реагентов и подготовки к ПЦР-амплификации)

Общий объем реакции – 25 мкл.

ВНИМАНИЕ! Запрещено изменять объем реакции. При изменении объема чувствительность метода резко снижается!

Для проведения одной реакции необходимо:

1. ПЦР-буфер – 5 мкл;
2. Праймер-микс – 5 мкл;
3. Образец (исследуемый образец и ОКО, прошедшего этап выделения ДНК) – 15 мкл.

Общий объем реакции – 25 мкл.

Готовить реакционные пробирки необходимо согласно таблице 5 в следующем порядке:

1. Промаркировать пробирки на 0,1-0,2 мл для ПЦР;
2. В отдельной одноразовой стерильной пробирке типа Эппендорф объемом 1,5-2,0 мл приготовить реакционную смесь: (N+3)х5 мкл ПЦР-буфера + (N+3)х5 мкл Праймер-микса, где N – количество исследуемых образцов. Перемешать на вортексе коротким центрифугированием;
3. В каждую пробирку для ПЦР внести по 10 мкл приготовленной реакционной смеси;
4. Внести в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 15 мкл выделенной ДНК. В пробирки с ПКО и ОКО препарат ДНК не вносится;
5. Внести в соответствующие пробирки ПКО и ОКО;
6. Для сброса капель со стенок отцентрифугировать пробирки в течение 1-3 сек. на микроцентрифуге-вортексе.

Таблица 5 - Схема расположения пробирок для проведения анализа

	Образец 1	Образец N	ПКО	ОКО
Праймер-микс	○	○	○	○

ПЦР-амплификация ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени

(производится в ЗОНЕ ПЦР – помещении для проведения ПЦР-амплификации)

1. Установить пробирки в реакционный модуль прибора для ПЦР в «реальном времени». Рекомендуется устанавливать пробирки по центру термоблока для равномерного прижима пробирок нагревающей крышкой;

2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, соблюдая инструкцию для используемого прибора. Указать тип анализа – качественный или количественный со стандартами. Протокол ПЦР указан в таблице 6;

Таблица 6 – Протокол ПЦР

Стадия	Температура, °C	Время, мин:сек	Каналы детекции	Всего циклов
1	95	02:00	-	1
2	95	00:15	-	5
	64	00:20		
3	95	00:15	FAM, HEX	40
	64	00:20		

3. Указать количество и идентификаторы образцов, отметить расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой;

4. Удостовериться, что в параметрах оптических измерений программы амплификации задействованы каналы детекции для FAM/Green и HEX/Yellow;

5. Запустить ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала;

6. По окончании выполнения программы приступить к анализу результатов.

11. Регистрация и интерпретация результатов

Регистрацию результатов проводят автоматически во время амплификации с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Рекомендации по установке пороговой линии

Для амплификаторов любой модели пороговая линия устанавливается индивидуально для каждого канала детекции на уровне, соответствующем 10-20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для ПКО в последнем цикле амплификации.

Интерпретация результатов выполняется по значениям C_t каналов, указанных в табл. 1. Учитываются только значения C_t , полученные на стадии ПЦР с флуоресцентной детекцией (то есть соответствующие стадии 3 – см. табл. 6).

Сначала оценивают прохождение реакции и значения C_t в контрольных образцах. Интерпретацию результатов в исследуемых образцах начинают только при правильном прохождении ПКО и ОКО.

В случае использования амплификаторов Rotor-Gene Q необходимо активировать функции «Динамич. фон» (Dynamic Tube), «Коррект. уклона» (Noise slope correction), установить значение 10% в разделе «Устранение выбросов» (Outlier Removal).

Интерпретация результатов в контрольных образцах

Для положительного контрольного образца и отрицательного контрольного образца с добавлением ВКО должны быть получены следующие результаты (таблица 7).

Таблица 7 – Результаты исследования для ПКО и ОКО

Контрольный образец	Канал, соответствующий флуорофору	
	FAM/Green	HEX/Yellow
ОКО+ВКО	C_t не указан или > 35	$C_t \leq 32$
ПКО	$C_t \leq 32$	

При получении для отрицательного контрольного образца с добавлением ВКО значений, отличающихся от указанных в таблице 8, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

При получении для положительного контрольного образца значений, отличающихся от указанных в таблице 8, требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

При повторном получении для ПКО значений, отличающихся от указанных в таблице 8, необходимо заменить реагенты.

Интерпретация результатов в исследуемых образцах ДНК

Анализ результатов представлен в таблице 8.

Таблица 8 – Принцип интерпретации результатов при проведении анализа

Значения C_t		Результат
FAM/Green (<i>Helicobacter pylori</i>)	HEX/Yellow (ВКО)	
$C_t \leq 35$	не учитывается	ДНК <i>Helicobacter pylori</i> обнаружена
C_t отсутствует или $C_t > 35$	$C_t \leq 32$	ДНК <i>Helicobacter pylori</i> не обнаружена или ниже предела обнаружения
C_t отсутствует или $C_t > 35$	C_t отсутствует или $C_t > 32$	Результат невалидный

Причиной получения невалидного результата может служить присутствие ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала, неверное выполнение протокола анализа, несоблюдение температурного режима ПЦР и др.

Причиной получения сомнительного результата может служить недостаточная концентрация ДНК в клиническом образце.

В случае невалидного результата заключение не выдается, необходимо повторно взять у пациента биоматериал и заново провести анализ.

При повторении невалидного результата повторить исследование набором реагентов другого производителя или другим методом.

Диагностическое значение полученного результата исследования:

Полученный положительный или отрицательный результат анализа может быть использован квалифицированным специалистом (врачом), с учетом данных клинической картины и других видов исследований в совокупности, для диагностики хеликобактериоза у пациентов вне зависимости от формы и стадии заболевания всех групп населения и контроля терапии.

12. Условия хранения, транспортирования и эксплуатации набора реагентов

Хранение

Набор реагентов в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 16 °С до минус 24 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от 2 °С до 8 °С до 14 суток.

Допускается заморозка/оттаивание набора не более 10 раз.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов следует всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Транспортировать при температуре от минус 16 °С до минус 24 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 °С до 8 °С до 14 суток. Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объем и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объем

термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Срок годности

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Срок годности вскрытых компонентов набора

12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при условии хранения при температуре от минус 16 °С до минус 24 °С.

Срок годности приготовленных для работы компонентов набора

1 час при соблюдении условий, препятствующих высыханию компонентов, а также контаминации посторонним биологическим материалом.

13. Утилизация

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

В соответствии с классификацией медицинских отходов наборы относятся к классу А (эпидемиологически безопасные отходы, приближенные по составу к твердым бытовым отходам). Неиспользованные реактивы в соответствии с п. 170 СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических)

мероприятий» собираются в многоразовые емкости или одноразовые пакеты любого цвета (кроме желтого и красного).

Оставшиеся после выполнения работ пробирки и материалы утилизируют в соответствии с МУ 287-113 (Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения).

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Пробирки и упаковка набора реагентов подлежат механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

14. Гарантийные обязательства, контакты

Предприятие-изготовитель гарантирует качество и безопасность набора реагентов в течение срока годности при соблюдении требований транспортирования и хранения продукции, а также при соблюдении правил эксплуатации.

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий или инцидентов направлять информацию по адресу:

Общество с ограниченной ответственностью «ТестГен»
(ООО «ТестГен»),
432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9, офис 13
Тел.: +7 (499) 705-03-75
www.testgen.ru
Служба технической поддержки:
Тел.: +7 927 981 58 81
E-mail: help@testgen.ru

Символы маркировки

Символ	Расшифровка
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Обратитесь к инструкции по применению
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Температурный диапазон
	Код партии
	Использовать до...
	Дата изготовления
	Хрупкое, обращаться осторожно
	Пиктограмма «Верх» показывает правильное положение груза в пространстве. Стрелки указывают на верхнюю часть содержимого. Транспортную упаковку с этим символом нельзя переворачивать или сваливать на бок. Ее нужно хранить и перевозить исключительно вертикально.

Приложение Б

Обозначение	Наименование документа
ГОСТ ISO 14971-2011	Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.
ГОСТ Р 51088-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.
ГОСТ Р 51352-2013	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Методы испытаний.
ГОСТ Р EN 13612-2010	Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro.
ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.
ГОСТ Р ИСО 23640-2015	Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro.
ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020	Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования.
ГОСТ ISO 13485-2017	Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью

10 (десять) листов

Должность: руководитель отдела сертификации
(по доверенности №95/01 от 30.12.2022 г.)

Халилова Я.М.



ООО «ТестГен»

Паспорт качества № 212

Набор реагентов для качественного определения ДНК *Helicobacter pylori* в клиническом материале человека методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени «НР-тест» по ТУ 21.20.23-059-97638376-2022

Номер партии (лот) 202306-212
Количество наборов в партии 2
Дата изготовления 2023-06
Срок годности 2024-06

Состав и характеристики набора:

Наименование показателя	Характеристики и нормы	Полученный результат	Вывод о соответствии															
1.1 Технические характеристики																		
1.1.1 ПЦР-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 480 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 480 мкл	Соответствует															
1.1.2 Праймер-микс	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета, 1 пробирка, 480 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость, может иметь оттенок сиреневого цвета, 1 пробирка, 480 мкл	Соответствует															
1.1.3 ПКО	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, по 480 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, по 480 мкл	Соответствует															
1.1.4 ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 950 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 950 мкл	Соответствует															
1.1.5 ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 пробирки, по 1800 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость, 2 пробирки, по 1800 мкл	Соответствует															
1.2 Комплектность	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-059-97638376-2022	В соответствии с п. 1.4 ТУ 21.20.23-059-97638376-2022	Соответствует															
1.3 Маркировка	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-059-97638376-2022	В соответствии с п. 4 ТУ 21.20.23-059-97638376-2022	Соответствует															
1.4 Упаковка	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-059-97638376-2022	В соответствии с п. 5 ТУ 21.20.23-059-97638376-2022	Соответствует															
2. Функциональные характеристики																		
Положительный результат с ПКО	Регистрация роста сигнала флуоресценции в пробирках с ПКО по каналу FAM Ct ≤ 32, по каналу HEX Ct ≤ 29.	<table><tr><td>FAM</td><td>HEX</td></tr><tr><td>28.7</td><td>28</td></tr></table>	FAM	HEX	28.7	28	Соответствует											
FAM	HEX																	
28.7	28																	
Прохождение реакции в образце ОКО+ВКО	В образце ОКО+ВКО по каналу FAM Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует), по каналу HEX Ct ≤ 29.	<table><tr><td>FAM</td><td>HEX</td></tr><tr><td>-</td><td>27,2</td></tr></table>	FAM	HEX	-	27,2	Соответствует											
FAM	HEX																	
-	27,2																	
Прохождение реакции в пробирках с КОС	В пробирках с КОС по каналу FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует)	В пробирках с КОС по каналам FAM и HEX Ct не указан (то есть график накопления флуоресценции отсутствует)	Соответствует															
Прохождение реакции в образце КОЧ+ВКО	В образце КОЧ+ВКО по каналу FAM во всех повторях (не менее 4) Ct ≤ 35, а по каналу HEX Ct ≤ 29.	<table><tr><td>повтор</td><td>FAM</td><td>HEX</td></tr><tr><td>1</td><td>30</td><td>27.7</td></tr><tr><td>2</td><td>30.3</td><td>27.7</td></tr><tr><td>3</td><td>29.3</td><td>26.9</td></tr><tr><td>4</td><td>29.5</td><td>27.3</td></tr></table>	повтор	FAM	HEX	1	30	27.7	2	30.3	27.7	3	29.3	26.9	4	29.5	27.3	Соответствует
повтор	FAM	HEX																
1	30	27.7																
2	30.3	27.7																
3	29.3	26.9																
4	29.5	27.3																

Хранение

Набор реагентов в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от минус 16 °С до минус 24 °С в течение всего срока годности набора, допускается хранение при температуре от 2 °С до 8 °С до 14 суток. Допускается заморозка/оттаивание набора не более 10 раз.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Транспортирование

Транспортировать набор реагентов следует всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.

Транспортировать при температуре от минус 16 °С до минус 24 °С в течение всего срока годности набора. Допускается транспортировка при температуре от 2 °С до 8 °С до 14 суток. Атмосферное давление не контролируется, так как не влияет на качество изделия.

Для обеспечения соблюдения условий транспортирования на протяжении всего срока транспортирования набор реагентов помещается в термоконтейнер пенополиуретановый многоразового использования для временного хранения и транспортирования с подготовленными хладоэлементами. Тип, объем и количество хладоэлементов, закладываемых в термоконтейнер с транспортируемыми наборами реагентов, а также объем термоконтейнера подбираются в зависимости от продолжительности и условий транспортирования.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Набор реагентов соответствует ТУ 21.20.23-059-97638376-2022

Дата выдачи паспорта: 06.06.2023

Штамп ОТК:



ООО «ТестГен»

Паспорт качества №212

Стандартный образец предприятия СОП-Helicobacter pylori

(для Набор реагентов для
качественного определения ДНК
Helicobacter pylori в клиническом
материале человека методом
полимеразной цепной реакции с
детекцией в режиме реального
времени «HP-тест» по ТУ 21.20.23-
059-97638376-2022)

Номер лота: 202307-243
Количество изделий в партии: 4
Изготовлен: 2023-07
Срок годности: 2024-07

Состав и характеристики СОП-Helicobacter pylori

№п/п	Наименование показателя	Характеристики и нормы	Полученный результат	Вывод о соответствии
1. Технические характеристики				
1	Внешний вид	Прозрачная бесцветная жидкость, 1000 мкл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1000 мкл	Соответствует
2. Функциональные характеристики				
1	Концентрация	Плазмида с синтетической вставкой фрагмента геномной ДНК Helicobacter pylori с концентрацией 1000 копий в 1 мл 10 % ТЕ-буфере (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА)	Проверку концентраций плазмид проводят спектрофотометрически с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000с (производства Thermo Scientific, США) по ГОСТ Р 8.657-2009 с диапазоном излучения 190-840 нм. pl. Helicobacter pylori – 395 нг/мкл Проводят титрование плазмид до разведения близкого к 6000 копий на 6 мкл (1000 000 копий/мл), как оптимального для дальнейшего приготовления стока плазмид. Далее готовят готовый к использованию СОП-Helicobacter pylori концентрацией 1000 копий/мл из стокового раствора 10^{-6} плазмидной ДНК в расчётном объёме буфера ТЕ (10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА).	Соответствует
2	Прохождение ПЦР-реакции	В образце СОП-Helicobacter pylori (+ВКО) по каналу FAM Ct ≤ 35, а по каналу HEX Ct ≤ 32.	FAM, Ct – 24,8; HEX, Ct – 25,6; Соответствует	Соответствует

Условия хранения: в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение всего срока годности набора.

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

СОП-Helicobacter pylori, хранившийся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежит.

Условия транспортирования: транспортировать транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.

Допускается транспортировка при температуре +4 °С до 10 суток, при комнатной температуре (15-25 °С) не более двух суток.

Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Дата выдачи паспорта: 21.07.2023

Штамп ОТК:

