

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

А.В. Ходяков

23.10.2024



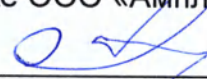
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ
ИНФЕКЦИЙ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH AII-ВАСТО (R)) ПО ТУ 21.20.23-044-
19926214-2024

Инструкция по применению версии 23.10.24

Лист утверждения

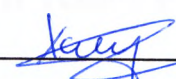
СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

 А.С. Коновалов

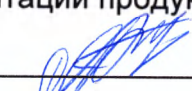
23.10.2024

Руководитель научной группы
ООО «Амплитек»

 Г.А. Хайруллина

23.10.2024

Научный сотрудник отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

 А.А. Филичева

23.10.2024

Amplitech All-Bacto (R)

Набор реагентов для качественного определения ДНК
возбудителей бактериальных кишечных инфекций в
биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией
в режиме «реального времени» (Amplitech All-Bacto (R))
по ТУ 21.20.23-044-19926214-2024

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

IVD

Форма 1 **REF** P034-1  48

Форма 2 **REF** P034-2  96

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 НАЗНАЧЕНИЕ	4
2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ	4
3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ	4
4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ	4
5 ФОРМЫ ВЫПУСКА	5
6 СОСТАВ.....	5
7 ПРИНЦИП МЕТОДА.....	6
7.1 Характеристика положительного контроля ПК F	7
8 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	7
9 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	7
10 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	9
11 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
11.1 Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 и автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции	10
11.2 Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 или 2. Проведение ПЦР и детекции.....	12
12 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	13
13 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ.....	15
14 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.....	16
14.1 Контроли, используемые в процессе исследования	16
14.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации.....	16
14.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований.....	16
15 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	17
15.1 Предел обнаружения.....	17
15.2 Аналитическая специфичность.....	17
15.3 Прецизионность измерения	18
15.4 Диагностические характеристики	18
16 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	19
16.1 Срок годности.....	19
16.2 Хранение	19
16.3 Транспортирование	19
16.4 Эксплуатация	19
17 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ.....	20
18 БИБЛИОГРАФИЯ	20
19 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	20
20 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	21
21 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА	21
22 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	21

ВВЕДЕНИЕ

1. Настоящая инструкция по применению версии 23.10.24 распространяется на медицинское изделие «Набор реагентов для качественного определения ДНК возбудителей бактериальных кишечных инфекций в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech All-Bacto (R)) по ТУ 21.20.23-044-19926214-2024» (далее – набор).

Краткое наименование набора: Amplitech All-Bacto (R).

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

2. Острые кишечные инфекции (ОКИ) – широкая группа инфекционных заболеваний с фекально-оральным механизмом передачи и преимущественным поражением органов пищеварительного тракта (гастроэнтериты, колиты). ОКИ могут быть как вирусной, так и бактериальной этиологии.

К бактериальным возбудителям относятся микроорганизмы комплекса шигелла (*Shigella* spp.) / энтероинвазивные *E. coli* (EIEC), рода Сальмонелла (*Salmonella* spp.), комплекс энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC), *S. dysenteriae* I типа, термофильные кампилобактерии (*Campylobacter* spp.).

Симптоматика ОКИ, независимо от этиологического агента, крайне разнообразна: от бессимптомного носительства, головной боли и слабости до диареи, тошноты, рвоты, спастической боли в животе и высокой температуры. В подобных случаях своевременная и точная диагностика возможна при лабораторном обследовании. ПЦР в реальном времени обладает высокой чувствительностью, специфичностью и объективностью полученных результатов.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для качественного определения ДНК возбудителей бактериальных кишечных инфекций: микроорганизмов комплекса шигелла (*Shigella* spp.) / энтероинвазивных *E. coli* (EIEC) (без дифференцировки), рода Сальмонелла (*Salmonella* spp.), комплекса энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC) / *S. dysenteriae* I типа и термофильных кампилобактерий (*Campylobacter* spp.) в биологическом материале человека (фекалии) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Набор реагентов не позволяет дифференцировать *S. dysenteriae* I типа от присутствия в исследуемом образце сочетания *Shigella* spp. / EIEC и EHEC. Для дифференциации *S. dysenteriae* I типа необходимо использовать бактериологические методы.

Набор предназначен для лабораторной диагностики *in vitro* (выявление ДНК микроорганизмов комплекса шигелла (*Shigella* spp.) / энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), рода Сальмонелла (*Salmonella* spp.), комплекса энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC) / *S. dysenteriae* I типа и термофильных кампилобактерий (*Campylobacter* spp.)). Применение набора не зависит от популяционных и демографических аспектов.

2 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

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

Набор может применяться в клинко-диагностических лабораториях.

3 ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказания к применению набора отсутствуют.

4 РИСКИ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ

При применении набора по назначению, в соответствии с данной инструкцией, риски и побочные эффекты отсутствуют.

5 ФОРМЫ ВЫПУСКА

Набор выпускается в двух формах¹ (см. таблицу 1).

Таблица 1

Описание форм выпуска набора

Форма	Описание	Количество исследований, в том числе для контролей
1	Готовые к применению реакционные ПЦР-смеси в виде геля, раскапанные в 96-луночный планшет	48
2	Готовые к применению реакционные ПЦР-смеси для разнесения по пробиркам	96

6 СОСТАВ

Состав набора указан в таблицах 2, 3, 4.

Таблица 2

Состав формы 1

Компонент	Номинальный объём, мл	Кол-во	Внешний вид
Планшет с реагентами All (R)-1/2	—	1 шт.	96-луночный делимый планшет, заклеенный защитной плёнкой, с реагентами в виде геля на дне пробирок
Плёнки для планшета	—	2 шт.	Клейкие плёнки
ВК (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с ДНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК F (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами ДНК выявляемых микроорганизмов)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	—	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	—	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	—	1 шт.	В электронном виде ² по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

Таблица 3

Расположение реагентов в планшете

Ряды пробирок	Реагент	Внешний вид
A, C, E, G	Смесь All (R)-1 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	Гель от светло-голубого до синего цвета на дне пробирок
B, D, F, H	Смесь All (R)-2 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	Гель от светло-розового до красного цвета на дне пробирок

¹ Набор в форме выпуска 1 упакован в коробку из картона, в форме выпуска 2 - в полиэтиленовый пакет с застёжкой Zip-Lock.

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

Таблица 4

Состав формы 2

Компонент	Номинальный объем, мл	Кол-во	Внешний вид
Смесь AII (RW)-1 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	0,96	1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло-серого до фиолетового цвета
Смесь AII (RW)-2 (Реакционная ПЦР-смесь со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами, термостабильной ДНК-полимеразой, дНТФ, солями)	0,96	1 пробирка	Прозрачная жидкость от светло-серого до фиолетового цвета
ВК (Раствор, содержащий генно-инженерную конструкцию с ДНК внутреннего контроля)	0,96	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ОК (Буферный раствор)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
ПК F (Раствор, содержащий генно-инженерные конструкции с фрагментами ДНК выявляемых микроорганизмов)	0,8	1 пробирка	Прозрачная бесцветная жидкость
Инструкция по применению	–	1 шт.	В бумажном виде и электронном виде по адресу: http://www.amplitech.ru/resources/
Краткое руководство	–	1 шт.	В бумажном виде
Паспорт	–	1 шт.	В электронном виде ³ по адресу: http://www.amplitech.ru/quality/

7 ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследование с помощью набора проводится методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Детекция продуктов амплификации и раздельное выявление мишеней обеспечивается применением в двух реакционных смесях для ПЦР флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, сигналы от которых регистрируются по различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 5).

Таблица 5

Канал детекции сигнала от флуорофора	Мишень	Область амплификации
Смесь AII (R)-1 / AII (RW)-1		
FAM	ДНК комплекса шигелл (<i>Shigella</i> spp.) / энтероинвазивных <i>E. coli</i> (EIEC)	ipaH gene
R6G ⁴	ДНК <i>Salmonella</i> spp.	ttrA gene
ROX	–	–
Cy5	ДНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность
Смесь AII (R)-2 / AII (RW)-2		
FAM	–	–
R6G	ДНК комплекса энтерогеморрагических <i>E. coli</i> (EHEC) / <i>S. dysenteriae</i> I типа	stx1 и stx2 gene
ROX	ДНК <i>Campylobacter</i> spp.	23S rRNA gene
Cy5	ДНК ВК	Искусственно синтезированная последовательность

³ В случае отсутствия доступа к Интернету обратитесь в службу технической поддержки по телефону (495) 374-13-46 для запроса о предоставлении бумажной версии паспорта.

⁴ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

7.1 Характеристика положительного контроля ПК F

Концентрация клонированных фрагментов ДНК всех выявляемых микроорганизмов в ПК F составляет $5 \lg \pm 0,5 \lg$ копий/мл. Концентрация определяется с помощью установленной производителем методики выполнения измерений на основе метода лимитирующих разведений [1, 2].

8 НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для работы с набором требуются оборудование и материалы, указанные в таблице 6.

Таблица 6

Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором

Необходимое оборудование и материалы в случае	
автоматизированной подготовки к проведению ПЦР для формы выпуска 1	ручной подготовки к проведению ПЦР для форм выпуска 1 и 2
- автоматическая станция пробоподготовки «Amplitech E1» («Амплитек», Россия; РУ № РЗН 2022/16981); - программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446)); - холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; - ёмкость для сброса использованных материалов; - перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.	- ПЦР-бокс; - центрифуга-вортекс (РУ № ФС № 2005/518); - дозаторы переменного объёма, механические или электронные, с возможностью дозирования от 5 до 200 мкл (РУ № ФСР 2009/05681); - программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология»; РУ № ФСР 2011/10229), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.; РУ № ФСЗ 2008/03399), Applied Biosystems QuantStudio 5 (Life Technologies Holdings Pte. Ltd.; РУ № РЗН 2019/8446)); - штатив для ПЦР-планшетов (при использовании формы 1) (РУ № ФСЗ 2011/10287); - штатив для пробирок объёмом 0,2 мл (при использовании формы 2); - холодильник с камерой, поддерживающей температуру от 2 °С до 8 °С; - пробирки для ПЦР объёмом 0,2 мл с оптически прозрачной крышкой, одноразовые, свободные от ДНКа и РНКа (при использовании формы 2); - наконечники для дозаторов переменного объёма, с фильтром, объёмом до 20 мкл, одноразовые, свободные от ДНКа и РНКа; - ёмкость для сброса использованных материалов; - перчатки медицинские, одноразовые, неопудренные.

9 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

Работа с набором должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований ГОСТ Р ИСО 15190 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов исследования.

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21 (раздел IV).

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Утилизировать реагенты и плёнки для планшета (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» к утилизации медицинских отходов класса Г.

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

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

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию, указанному в таблицах 2-4 для соответствующей формы выпуска набора.

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

- Не использовать набор по истечении срока годности.

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

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

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

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

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

10 ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Набор предназначен для исследования только биологического материала, указанного в разделе 1. Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение биологического материала следует проводить в соответствии с:

- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»;
- требованиями, перечисленными в таблицах 7 и 8.

Таблица 7

Требования к взятию и предварительной обработке исследуемого материала

Взятие и предобработка фекалий

Перенести образец фекалий в количестве 1–3 г (1–3 мл), используя в зависимости от консистенции образца отдельный наконечник с фильтром или одноразовую лопатку, в стерильный одноразовый контейнер.

Предобработка:

При исследовании нативных фекалий без предшествующего замораживания готовят фекальную суспензию. При водянистой консистенции фекалий приготовление суспензии не требуется.

Предобработка фекалий водянистой консистенции, свежеприготовленной суспензии фекалий или суспензии, подвергавшейся замораживанию с глицерином, проводится методом экспресс-фильтрации.

Приготовление фекальной суспензии

В пробирку, содержащую 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида), отдельным наконечником с фильтром (или одноразовой лопаткой) внести 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендировать на вортексе до образования гомогенной суспензии.

При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к приготовленной суспензии фекалий добавить глицерин в конечной концентрации 15–20 %. После тщательной гомогенизации с использованием вортекса и экспозиции с глицерином в течение 30–40 мин пробы заморозить.

Подготовка фекалий методом центрифугирования

Пробирки с суспензией или водянистыми фекалиями центрифугировать 5 мин при 7000–12000 $\times g$. Используя наконечник с фильтром, отобрать из пробирки бактериальную фракцию в объеме 50 мкл (верхняя бело-желтая часть образовавшегося осадка). При отсутствии бело-желтого пограничного слоя между осадком и супернатантом отобрать 100 мкл с границы осадка и супернатанта. При отсутствии осадка отобрать 100 мкл со дна пробирки.

Отобранную часть пробы перенести в новую пробирку и использовать для проведения экстракции ДНК. Допускается разведение супернатанта фосфатно-солевым буфером в соотношении 1:1 в случае получения невалидных результатов ПЦР-исследования из-за ингибирования реакции амплификации.

Подготовка фекалий методом экспресс-фильтрации

Необходимо использовать два наконечника объемом 1000 мкл: один с аэрозольным фильтром, другой – без него. В наконечник без аэрозольного фильтра вставить отрезанную рабочую часть одноразового ватного зонда (ватной палочки) и зафиксировать проталкиванием в суженную часть наконечника. Наконечником с аэрозольным фильтром забрать 1 мл фекальной суспензии, вставить его в подготовленный наконечник с ватным фильтром и пропустить суспензию через фильтр в новую одноразовую пробирку.

При затруднённой фильтрации рекомендуется уменьшить концентрацию фекальной суспензии. Допускается разведение супернатанта фосфатно-солевым буфером в соотношении 1:1 в случае получения невалидных результатов ПЦР-исследования из-за ингибирования реакции амплификации.

Таблица 8

Требования к условиям транспортирования и хранения исследуемого материала

Условия транспортирования и хранения фекалий

- До предобработки при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) не более 6 ч или при температуре от 2 °C до 8 °C не более 3 суток.
- После предобработки при температуре минус 20 °C в течение 1 недели.
- Допускается однократное замораживание материала.

11 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

11.1 Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 и автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

Экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей, а также внесение образцов экстрагированной ДНК в пробирки планшета с реакционными ПЦР-смесями провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции НК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек»).

11.1.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК F и осадить капли на вортексе.

11.1.2 Подготовить картридж с реагентами из набора «НК-100 (R)» и внести в него исследуемые образцы и контроли согласно инструкции по его применению.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК F не менее чем в одном повторе.

11.1.3 Установить на рабочий стол автоматической станции картридж с внесёнными исследуемыми образцами и контролями, а также расходные материалы, входящие в состав набора «НК-100 (R)», согласно руководству по эксплуатации станции.

11.1.4 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок, учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Схема планшета представлена на рисунке 1.

Ряд	Вид смеси	Столбцы											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	All (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	All (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	All (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	All (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	All (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	All (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	All (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	All (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Рисунок 1 – Схема планшета с реагентами

11.1.5 Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку.

11.1.6 Установить отрезанные пробирки со Смесями на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для элюата.

11.1.7 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:

а) протокола экстракции ДНК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «НК-100 (R)»;

Примечание – В протоколе указать объем элюции 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ПЦР объем элюции не требует ручного ввода, так как уже включён в протокол подготовки к проведению ПЦР.

б) протокола подготовки к проведению ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «Amplitech All-Bacto (R)».

ВНИМАНИЕ! Запуск протокола необходимо провести в течение 30 минут после установки всех реагентов на рабочем столе станции.

11.1.8 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech All-Bacto (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесённым элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

11.1.9 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 9.

Таблица 9

Программа ПЦР и детекции при подготовке к проведению ПЦР с использованием автоматической станции «Amplitech E1»

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	2 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ⁵ , ROX, Cy5	

Примечания

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

11.1.10 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

⁵ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

11.2 Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 или 2. Проведение ПЦР и детекции

11.2.1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК F и осадить капли на вортексе.

11.2.2 Провести экстракцию ДНК из исследуемого материала и контролей с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Ампитек») согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объеме 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК F не менее чем в одном повторе.

11.2.3 В зависимости от используемой формы выпуска набора «Amplitech All-Bacto (R)» провести подготовку к проведению ПЦР в соответствии с таблицей 10.

Таблица 10

Подготовка к проведению ПЦР в зависимости от формы выпуска набора «Amplitech All-Bacto (R)»

Подготовка к проведению ПЦР при использовании	
формы 1	формы 2
- Отрезать от планшета необходимое количество пробирок со Смесями All (R)-1, All (R)-2, учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Схема планшета представлена на рисунке 1. - Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку. - Для удобства внесения образцов ДНК рекомендуется установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов. - Внести в подготовленные пробирки по 20 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК F). ВНИМАНИЕ! Каждый образец ДНК вносится в две пробирки с разными реакционными Смесями, т.е. для каждого образца по одной пробирке с каждым видом Смеси (All (R)-1, All (R)-2). ВНИМАНИЕ! При внесении ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь. - Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха. - После внесения образцов ДНК заклеить пробирки плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech All-Bacto (R)».	- Перемешать содержимое пробирок со Смесями All (RW)-1, All (RW)-2 и осадить капли на вортексе. - Выставить в штатив для каждого исследуемого и контрольного образца по две ПЦР-пробирки в два ряда, так как каждый образец ДНК исследуется в двух пробирках с разными реакционными Смесями (All (RW)-1, All (RW)-2). Промаркировать пробирки. - Внести в первый ряд подготовленных ПЦР-пробирок по 10 мкл Смеси All (RW)-1, во второй ряд по 10 мкл Смеси All (RW)-2. - Внести в пробирки с реакционными Смесями по 15 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК F). ВНИМАНИЕ! Каждый образец ДНК вносится в две пробирки с разными реакционными Смесями (All (RW)-1, All (RW)-2). ВНИМАНИЕ! При внесении ДНК необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь. - Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха. - После внесения образцов ДНК закрыть пробирки крышкой.

ВНИМАНИЕ! Пробирки после внесения ДНК не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесенным элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

- 11.2.4 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной в таблице 11.

Таблица 11

Программа ПЦР и детекции при ручной подготовке к проведению ПЦР

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ⁶ , ROX, Cy5	

Примечания

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

- 11.2.5 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

12 УЧЁТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 12.1 Учёт результатов осуществляется с помощью программного обеспечения используемого амплификатора согласно инструкции по его применению. Рекомендуется выставить пороговую линию на уровне 10 % от разгорания положительного контроля. Кривые флуоресценции, пересекающие пороговую линию, должны иметь сигмообразную форму.
- 12.2 Провести интерпретацию результатов для исследуемых образцов согласно таблице 12.

⁶ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Таблица 12

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

Результат		Интерпретация
Смесь AII (R)-1 / Смесь AII (RW)-1		
1	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁷ . По каналам FAM, R6G значения Ct отсутствуют или больше граничного.	ДНК комплекса шигелл (<i>Shigella</i> spp.) / энтероинвазивных <i>E. coli</i> (EIEC) и сальмонелл (<i>Salmonella</i> spp.) в образце не выявлены.
2	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу FAM значение Ct определено и меньше граничного.	В образце выявлена ДНК комплекса шигелл (<i>Shigella</i> spp.) / энтероинвазивных <i>E. coli</i> (EIEC)
3	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу R6G значение Ct определено и меньше граничного.	В образце выявлена ДНК сальмонелл (<i>Salmonella</i> spp.)
4	По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам FAM и R6G значения Ct отсутствуют.	Невалидный результат
Смесь AII (R)-2 / Смесь AII (RW)-2		
1	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного. По каналам R6G, ROX значения Ct отсутствуют или больше граничного.	ДНК энтерогеморрагических <i>E. coli</i> (EHEC) и термофильных кампилобактерий (<i>Campylobacter</i> spp.) в образце не выявлены.
2	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу R6G значение Ct определено и меньше граничного.	В образце выявлена ДНК энтерогеморрагических <i>E. coli</i> (EHEC).
3	По каналу Cy5 значение Ct определено или отсутствует. По каналу ROX значение Ct определено и меньше граничного.	В образце выявлена ДНК термофильных кампилобактерий (<i>Campylobacter</i> spp.).
4	По каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного. По каналам R6G и ROX значения Ct отсутствуют.	Невалидный результат

ВНИМАНИЕ! Набор реагентов не позволяет дифференцировать ДНК *S. dysenteriae* I типа от присутствия в исследуемом образце сочетания *Shigella* spp. / EIEC и EHEC, так как в обоих случаях будет получено значение Ct по каналам FAM (для Смеси AII (R)-1 / Смеси AII (RW)-1) и R6G (для Смеси AII (R)-2 / Смеси AII (RW)-2). Результат в таком случае следует интерпретировать как: «В образце выявлена ДНК *S. dysenteriae* I типа или ДНК комплекса шигелл (*Shigella* spp.) / энтероинвазивных *E. coli* (EIEC) и энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC)».

Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей 13.

Таблица 13

Критерии оценки для контролей

Контроль	Норма
Смесь AII (R)-1 / Смесь AII (RW)-1	
ОК	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного ⁷ . По каналам FAM, R6G значения Ct отсутствуют.
ПК F	По каналам FAM, R6G и Cy5 значение Ct определено не больше граничного.
Смесь AII (R)-2 / Смесь AII (RW)-2	
ОК	По каналу Cy5 значение Ct определено не больше граничного. По каналам R6G, ROX значения Ct отсутствуют.
ПК F	По каналам R6G, ROX, Cy5 значение Ct определено не больше граничного.

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

13 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Рекомендации по устранению возможных ошибок, получаемых для исследуемых образцов и контролей в процессе исследования с помощью набора, указаны в таблице 14.

Таблица 14

Рекомендации по устранению ошибок

Ошибка	Возможная причина возникновения	Рекомендации по устранению
Для ПК на Смеси All (R)-1/ All (RW)-1 значение Ct по каналу FAM и/или R6G и/или Cy5 отсутствует или определено больше граничного ⁸ .	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ПК на Смеси All (R)-2/ All (RW)-2 значение Ct по каналу R6G и/или ROX и/или Cy5 отсутствует или определено больше граничного.		
Для ОК на любой из Смесей по каналу Cy5 значение Ct отсутствует или определено больше граничного.	Некорректное проведение экстракции ДНК и/или ПЦР.	Повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК на Смеси All (R)-1/ All (RW)-1 по каналу FAM и/или R6G определено значение Ct.	Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации.	Предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.
Для ОК на Смеси All (R)-2/ All (RW)-2 по каналу R6G и/или ROX определено значение Ct.	Контаминация реагентов или исследуемых образцов продуктами амплификации.	
Невалидный результат для исследуемого образца на любой из Смесей (значение Ct по каналу Cy5 отсутствует или определено больше граничного, по каналам FAM, R6G, ROX значения Ct отсутствуют или больше граничного).	Некорректное проведение экстракции ДНК.	Повторить исследование данного исследуемого образца, начиная с этапа пробоподготовки.
Для исследуемого образца/контролей определено значение Ct, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъёма (график представляет собой приблизительно прямую линию).	Некорректный выбор уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Некорректное проведение ПЦР.	Проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчёта базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца или, в случае некорректного вида графика для контроля, амплификацию и детекцию для всех исследуемых образцов и контролей.

⁸ Граничные значения Ct указаны в кратком руководстве по применению набора.

14 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

14.1 Контроли, используемые в процессе исследования

Результаты исследования контролей должны соответствовать критериям оценки, указанным в разделе 12.

14.1.1 Отрицательный и положительный контроли

Каждая группа экстрагируемых образцов должна включать контрольные образцы:

- ОК для выявления контаминации в процессе проведения исследования;
- ПК F для контроля корректного прохождения исследования.

14.1.2 Внутренний контроль

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

14.2 Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

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

14.3 Внутренний контроль качества лабораторных исследований

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

;

15 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА⁹

15.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения набора указан в таблице 15.

Таблица 15

Предел обнаружения

Мишень	Предел обнаружения, копий/мл	95 %-ый ДИ, копий/мл
ДНК комплекса шигелл (<i>Shigella</i> spp.) / энтероинвазивных <i>E. coli</i> (EIEC)	1000	594-1408
ДНК <i>Salmonella</i> spp.	1000	485-1099
ДНК комплекса энтерогеморрагических <i>E. coli</i> (EHEC) / <i>S. dysenteriae</i> I типа	1000	530-1297
ДНК <i>Campylobacter</i> spp.	1000	567-1420

15.2 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора оценивалась при тестировании микроорганизмов, указанных в таблице 16, геномной ДНК человека, а также НК выявляемых микроорганизмов. НК микроорганизмов исследовалась в концентрации не менее $1 \cdot 10^6$ копий/мл, геномная ДНК человека - в концентрации 1 мкг/мл. По итогам тестирования ложноположительных результатов выявлено не было.

Таблица 16

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Наименование	Наименование	Наименование
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Adenovirus F	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Astrovirus	Norovirus GI	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Clostridium difficile</i>	Norovirus GII	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Enterobacterium</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	Rotavirus A	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

15.2.1 Потенциально интерферирующие вещества

Потенциально интерферирующие вещества (ингибиторы ПЦР) и их максимальные концентрации в образце, для которых оценивалось их ингибирующее влияние на ПЦР, перечислены в таблице 17.

Таблица 17

Потенциально интерферирующие вещества

Исследуемый материал	Интерферент	Активный компонент	Тип интерферента	Концентрация вещества в образце	Обоснование исследованной концентрации
Фекалии	Цельная кровь	Гемоглобин, холестерин, триглицериды	Эндогенная субстанция	5 % v/v	Объем в образце в условиях «наихудшего случая»
	Крахмал	—		5 % v/v	
	Глицерин	—	Консервант при предобработке	20 %	Максимально возможный объем в образце

⁹ Заявленные аналитические характеристики набора, кроме аналитической специфичности, проверены с использованием стандартных образцов предприятия, содержащих векторы со специфическими последовательностями НК выявляемых микроорганизмов.

В результате испытаний подтверждено, что влияние исследованных потенциально интерферирующих веществ на ПЦР, проводимую с использованием набора «Amplitech All-Bacto (R)», отсутствует.

15.3 Прецизионность измерения

Коэффициент вариации повторяемости CV_n пороговых циклов (C_t), характеризующий внутрисерийную повторяемость измерений с использованием набора, не превышает 5 %.

Коэффициент вариации воспроизводимости CV_v пороговых циклов (C_t), характеризующий межсерийную воспроизводимость измерений с использованием набора, не превышает 10 %.

15.4 Диагностические характеристики

Значения диагностической чувствительности (ДЧ) и диагностической специфичности (ДС) набора с доверительной вероятностью 95 % указаны в таблице 18.

Таблица 18

Диагностические характеристики

Мишень	Количество образцов		ДЧ, %	ДС, %
	положит.	отрицат.		
ДНК комплекса шигелл (<i>Shigella</i> spp.) / энтероинвазивных <i>E. coli</i> (EIEC)	111	76	97,3 – 100	96,1 – 100
ДНК <i>Salmonella</i> spp.	111	76	97,3 – 100	96,1 – 100
ДНК комплекса энтерогеморрагических <i>E. coli</i> (EHEC) / <i>S. dysenteriae</i> I типа	98	91	97,0 – 100	96,8 – 100
ДНК <i>Campylobacter</i> spp.	96	91	96,9 – 100	96,8 – 100

16 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

16.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты ВК, ПК F, ОК, Смесь АII (RW)-1, Смесь АII (RW)-2 использовать до истечения срока годности набора.

Планшет с реагентами АII (R)-1/2 после снятия защитной плёнки хранить не более 30 минут.

Не допускается смешивать компоненты наборов разных серий и использовать набор по истечении срока годности.

16.2 Хранение

Форму выпуска 1 в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 % в защищённом от солнечного света месте. Планшет с реагентами АII (R)-1/2 беречь от влаги. После транспортирования допускается хранить набор не более 5 суток при температуре от 8 °С до 25 °С.

Форму выпуска 2 в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 % в защищённом от солнечного света месте.

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

16.3 Транспортирование

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

Допускается транспортировать набор формы выпуска 1 при температуре от 8 °С до 25 °С не более 10 суток.

16.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Повторное применение использованных для исследования реагентов не допускается.

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

16 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

16.1 Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления.

После вскрытия реагенты ВК, ПК F, ОК, Смесь АII (RW)-1, Смесь АII (RW)-2 использовать до истечения срока годности набора.

Планшет с реагентами АII (R)-1/2 после снятия защитной плёнки хранить не более 30 минут.

Не допускается смешивать компоненты наборов разных серий и использовать набор по истечении срока годности.

16.2 Хранение

Форму выпуска 1 в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 % в защищённом от солнечного света месте. Планшет с реагентами АII (R)-1/2 беречь от влаги. После транспортирования допускается хранить набор не более 5 суток при температуре от 8 °С до 25 °С.

Форму выпуска 2 в упаковке предприятия-изготовителя хранить при температуре от 2 °С до 8 °С и относительной влажности воздуха от 25 % до 75 % в защищённом от солнечного света месте.

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

16.3 Транспортирование

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

Допускается транспортировать набор формы выпуска 1 при температуре от 8 °С до 25 °С не более 10 суток.

16.4 Эксплуатация

Реагенты, входящие в состав набора, готовы к использованию.

Повторное применение использованных для исследования реагентов не допускается.

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

17 ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применены следующие сокращения:

Ct	– cycle threshold (пороговый цикл)
в.	– версия
ВК	– внутренний контроль
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
ОК	– отрицательный контроль
ОТ	– обратная транскрипция
ПК	– положительный контроль
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНКаза	– рибонуклеаза

18 БИБЛИОГРАФИЯ

1. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies // J. Immunology. – 1981. – Vol. 126. – P. 1614–1619.
2. Allen G. Rodrigo, Paul C. Goracke, Kiarash Rowhanian, James I. Mullins. Quantitation of target molecules from polymerase chain reaction-based limiting dilution assays // AIDS research and human retroviruses. – 1997. – Vol. 13 (9). – P. 737–742.

19 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

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 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний

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 23840-2015 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Оценка стабильности реагентов для диагностики *in vitro*

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2023 Изделия медицинские. Символы, применяемые для передачи информации, предоставляемой изготовителем. Часть 1. Основные требования

20 ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

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

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

21 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

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

22 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Изготовитель		Код серии
	Дата изготовления		Использовать до
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Не допускать воздействия солнечного света
	Содержимого достаточно для проведения $\leq n$ тестов		Не допускать воздействия влаги
	Номер по каталогу		Диапазон влажности



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

Лист регистрации изменений

[illegible]

Пронумеровано, скреплено и прошито

23 (двадцать три)
лист (ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«Амплик»

А.В. Ходяков



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 23 ЛИСТОВ

07 ноября 2024 год

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



КОПИЯ
ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

А.В. Ходяков



15.08.2024

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ
ИНФЕКЦИЙ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH AII-ВАСТО (R)) ПО ТУ 21.20.23-044-
19926214-2024

Краткое руководство для формы выпуска 1

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

А.С. Коновалов

26.07.2024

Научный сотрудник отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

А.А. Филичева

26.07.2024

Amplitech All-Bacto (R)

Набор реагентов для качественного определения ДНК возбудителей бактериальных кишечных инфекций в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech All-Bacto (R)) по ТУ 21.20.23-044-19926214-2024

КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО

IVD

REF

P034-1

LOT

xxxx



48

ВНИМАНИЕ! Перед использованием набора необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению.

Автоматизированная экстракция ДНК и подготовка к проведению ПЦР с использованием формы выпуска 1 и автоматической станции «Amplitech E1». Проведение ПЦР и детекции

Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы ДНК, экстрагированной из фекалий.

Экстракцию ДНК и внесение образцов экстрагированной ДНК в пробирки планшета с реагентами All (R)-1/2 провести с использованием автоматической станции «Amplitech E1» (ООО «Амплитек») согласно руководству по её эксплуатации и процедуре, указанной ниже. Для экстракции ДНК необходимо использовать форму выпуска 1 набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек»).

ВНИМАНИЕ! Перед началом работы необходимо ознакомиться с руководством по эксплуатации автоматической станции «Amplitech E1».

- 1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК F и осадить капли на вортексе.
- 2 Провести экстракцию ДНК с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек») формы 1 (с применением автоматической методики) согласно инструкции по его применению.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК F не менее чем в одном повторе.

- 3 Отрезать от планшета необходимое количество пробирок учитывая, что на каждый исследуемый и контрольный образец должно приходиться по одной пробирке каждого вида Смеси. Снять с отрезанных пробирок защитную плёнку. Схема планшета представлена на рисунке 1.

Столбцы

Ряд	Вид смеси	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	All (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	All (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	All (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	All (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	All (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	All (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	All (R)-1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	All (R)-2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Рисунок 1 - Схема планшета с реагентами

- 4 Установить отрезанные пробирки со Смесями на рабочий стол автоматической станции в адаптер для контейнеров для злюата.

5 Запустить выполнение следующих протоколов согласно руководству по эксплуатации станции «Amplitech E1»:

а) протокола экстракции ДНК с использованием штрих-кода для протокола, указанного в кратком руководстве по применению набора «НК-100 (R)»;

Примечание – В протоколе указать объем элюции 100 мкл. В случае одновременного запуска протоколов экстракции и подготовки к проведению ПЦР объем элюции не требует ручного ввода, так как уже включен в протокол подготовки к проведению ПЦР.

б) протокола подготовки к проведению ПЦР с использованием штрих-кода для протокола, указанного ниже.



ВНИМАНИЕ! Запуск протокола необходимо провести в течение 30 минут после установки всех реагентов на рабочем столе станции.

6 После завершения протоколов вынуть адаптер с пробирками и заклеить их плёнкой, входящей в состав набора «Amplitech All-Bacto (R)». Элюат, внесённый в пробирки, содержит полученную в процессе экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ! Пробирки, заклеенные плёнкой, не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на защитную плёнку. Пробирки с реакционной смесью с внесённым элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

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

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	2 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ¹ , ROX, Cy5	

Примечания

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

8 Поместить пробирки с реакционными смесями и элюатом в амплификатор и запустить программу.

Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР. Проведение ПЦР и детекции

При необходимости ручной подготовки к ПЦР после экстракции ДНК с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек») (с применением автоматической или ручной методики), необходимо:

- 1 Установить отрезанные пробирки в штатив для ПЦР-планшетов.
- 2 Внести в подготовленные пробирки по **20 мкл** образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК F).
- 3 Программа амплификации для этого случая описана ниже:

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	42
	60	20 с	FAM, R6G ¹ , ROX, Cy5	

¹ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Учёт и интерпретация результатов

- 1 Результаты интерпретировать на основании наличия (отсутствия) Ct (кривых накопления флуоресцентного сигнала, пересекающих пороговую линию) по детектируемым каналам в соответствии с таблицей:

Наличие Ct	FAM	R6G ²	ROX
Смесь All (R)-1			
Выявлена ДНК	<i>Shigella spp.</i> / EIEC	<i>Salmonella spp.</i>	-
Смесь All (R)-2			
Выявлена ДНК	-	EHEC	<i>Campylobacter spp.</i>

Примечание – В случае отсутствия ДНК выявляемых возбудителей в исследуемом образце, необходимо проверить наличие Ct для обеих смесей по каналу **Cy5** (граничные значения указаны в таблице ниже). В противном случае результат считать **невалидным**.

ВНИМАНИЕ! Если для исследуемого образца получено значение Ct по каналам FAM (для Смеси All (R)-1) и R6G (для Смеси All (R)-2), то результат следует интерпретировать так:

«В образце выявлена ДНК *S. dysenteriae* I типа или ДНК комплекса шигелл (*Shigella spp.*) / энтероинвазивных *E. coli* (EIEC) и энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC).»

- 2 Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей³, приведённой ниже:

Образец	Граничное значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G	ROX	Cy5
Смесь All (R)-1				
Исследуемые образцы	-	-	-	≤ 35
ОК	-	-	-	≤ 35
ПК F	≤ 33	≤ 33	-	≤ 35
Смесь All (R)-2				
Исследуемые образцы	-	-	-	≤ 33
ОК	-	-	-	≤ 33
ПК F	-	≤ 33	≤ 33	≤ 33

² Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC

³ Переменная информация, специфичная для лота, выделена цветом.

Лист регистрации изменений

[illegible]

Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 5 листа(-ов)

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

Ходяков А.В.

Подпись



КОПИЯ
ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Амплитек»

А.В. Ходяков

15.08.2024



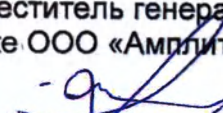
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КИШЕЧНЫХ
ИНФЕКЦИЙ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ЧЕЛОВЕКА
МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО
ВРЕМЕНИ» (AMPLITECH AII-ВАСТО (R)) ПО ТУ 21.20.23-044-
19926214-2024

Краткое руководство для формы выпуска 2

Лист утверждения

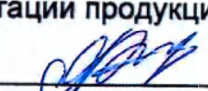
СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора по
науке ООО «Амплитек»

 А.С. Коновалов

26.07.2024

Научный сотрудник отдела разработки и
адаптации продукции ООО «Амплитек»

 А.А. Филичева

26.07.2024

Amplitech All-Bacto (R)

Набор реагентов для качественного определения ДНК возбудителей бактериальных кишечных инфекций в биологическом материале человека методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Amplitech All-Bacto (R))
по ТУ 21.20.23-044-19926214-2024

КРАТКОЕ РУКОВОДСТВО

IVD

REF

P034-2

LOT

xxxx

Σ

96

ВНИМАНИЕ! Перед использованием набора необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению.

Экстракция ДНК и ручная подготовка к проведению ПЦР. Проведение ПЦР и детекции

Материалом для проведения ПЦР-исследования служат образцы ДНК, экстрагированной из фекалий.

Для экстракции ДНК необходимо использовать набор реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек»).

- 1 Перемешать содержимое пробирок с реагентами ВК, ОК и ПК F и осадить капли на вортексе.
- 2 Провести экстракцию ДНК с использованием набора реагентов «НК-100 (R)» (ООО «Амплитек») формы 1 или формы 2 (с применением автоматической или ручной методики соответственно) согласно инструкции по его применению.

Примечание – Элюцию провести в объеме 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой контролей ОК и ПК F не менее чем в одном повторе.

- 3 Перемешать содержимое пробирок со Смесьями All (RW)-1, All (RW)-2 и осадить капли на вортексе.
 - 4 Выставить в штатив для каждого исследуемого и контрольного образца по две ПЦР-пробирки в два ряда, так как каждый образец ДНК исследуется в двух пробирках с разными реакционными Смесьями (All (RW)-1, All (RW)-2). Промаркировать пробирки.
 - 5 Внести в первый ряд подготовленных ПЦР-пробирок по 10 мкл Смеси All (RW)-1, во второй ряд по 10 мкл Смеси All (RW)-2.
 - 6 Внести в пробирки с реакционными Смесьями по 15 мкл образцов ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов и контролей (ОК и ПК F).
- ВНИМАНИЕ!** Каждый образец ДНК вносится в две пробирки с разными реакционными Смесьями (All (RW)-1, All (RW)-2).

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

- 7 Перемешать содержимое пипетированием, не допуская пузырьков воздуха.
 - 8 После внесения образцов ДНК закрыть пробирки крышкой.
- ВНИМАНИЕ!** Пробирки после внесения ДНК не переворачивать и не встряхивать, чтобы избежать разбрызгивания содержимого по стенкам пробирок и попадания их на крышку. Пробирки с реакционной смесью с внесенным элюатом не подлежат хранению. Необходимо незамедлительно произвести запуск реакции амплификации.

- 9 Запрограммировать амплификатор для проведения ПЦР и детекции флуоресцентного сигнала согласно инструкции по его применению по программе, указанной ниже.

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	—	1
2	95	15 мин	—	1
3	95	10 с	—	42
	60	20 с	FAM, R6G ¹ , ROX, Cy5	

¹ Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

Примечания

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

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

Учёт и интерпретация результатов

- 1 Результаты интерпретировать на основании наличия (отсутствия) Ct (кривых накопления флуоресцентного сигнала, пересекающих пороговую линию) по детектируемым каналам в соответствии с таблицей:

Наличие Ct	FAM	R6G ²	ROX
Смесь All (RW)-1			
Выявлена ДНК	<i>Shigella spp./ EIEC</i>	<i>Salmonella spp.</i>	-
Смесь All (RW)-2			
Выявлена ДНК	-	EHEC	<i>Campylobacter spp</i>

Примечание – В случае отсутствия ДНК выявляемых возбудителей в исследуемом образце, необходимо проверить наличие Ct для всех смесей по каналу **Cy5** (граничные значения указаны в таблице ниже). В противном случае результат считать **невалидным**.

ВНИМАНИЕ! Если для исследуемого образца получено значение Ct по каналам FAM (для Смеси All (R)-1) и R6G (для Смеси All (R)-2), то результат следует интерпретировать так:

«В образце выявлена ДНК *S. dysenteriae* I типа или ДНК комплекса шигелл (*Shigella spp.*) / энтероинвазивных *E. coli* (EIEC) и энтерогеморрагических *E. coli* (EHEC).»

- 2 Результат исследования считают достоверным, если получены валидные результаты для контролей в соответствии с таблицей³, приведённой ниже:

Образец	Граничное значение порогового цикла (Ct) по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G	ROX	Cy5
Смесь All (RW)-1				
Исследуемые образцы	—	—	—	≤ 36
ОК	—	—	—	≤ 36
ПК F	≤ 34	≤ 34	—	≤ 36
Смесь All (RW)-2				
Исследуемые образцы	—	—	—	≤ 34
ОК	—	—	—	≤ 34
ПК F	—	≤ 34	≤ 34	≤ 34

² Сигнал от флуорофора R6G регистрируется по каналу детекции сигнала от аналогичных флуорофоров HEX и VIC.

³ Переменная информация, специфичная для лота, выделена цветом.

Лист регистрации изменений

[illegible]



Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 4 листа(-ов)

Генеральный директор
ООО «Амплик»

Ходяков А.В.

Подпись

