



НАБІР

ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК CHLAMYDIA TRACHOMATIS

Кат. №: **LUA-PCR.СТ.150**

Дата випуску інструкції: **11-07-2022**

Кількість тестів: **150**

Версія: **0**

Якісна ПЛР у реальному часі для визначення Chlamydia trachomatis

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір для виявлення ДНК *Chlamydia trachomatis* ПЛР у реальному часі з кодом LUA-PCR.СТ.150 призначений для якісного виявлення ДНК *Chlamydia trachomatis* у мазках із уретри/цервікального каналу та сечі людини з одночасним контролем реакції екстракції/ампліфікації за допомогою Внутрішнього Контролю (IC).

Важлива примітка: Набір LUA-PCR.СТ.150 здатний виявити шведський варіант *C.trachomatis*.

В. ВСТУП

Chlamydia trachomatis (СТ), облигатна внутрішньоклітинна бактерія, є найпоширенішою інфекцією, що передається статевим шляхом, у всьому світі. СТ-інфекція може викликати уретрит, цервіцит та запальні захворювання органів малого таза у жінок. Понад 50% інфекцій *Chlamydia trachomatis* протікають безсимптомно, вони можуть залишатися непоміченими протягом тривалого періоду часу. Неліковані або недіагностовані інфекції шийки матки у жінок можуть піднятися у верхні статеві шляхи, спричиняючи запальні захворювання органів малого таза та позаматкову вагітність. Безпліддя у чоловіків і жінок може бути наслідком нелікованих або недіагностованих хламідійних інфекцій. *Chlamydia trachomatis* можна легко вилікувати антибіотиками. Разова доза азитроміцину або тижневий прийом доксицикліну (двічі на день) є найбільш часто використовуваними методами лікування. СТ містить одну хромосому 1.043000 вр. Геном кодує приблизно 875 білків, не всі з яких обов'язково експресуються. Крім хромосоми, СТ зазвичай містить позахромосомний генетичний елемент (криптична плазмід) розміром 7493 вр. Плазмід дуже законсервована, зі зміною нуклеотидної послідовності менше ніж на 1%. Методи ампліфікації нуклеїнових кислот (NAAT) перевершили культуру клітин і виявлення антигену для діагностики інфекцій *Chlamydia trachomatis* через їх підвищену чутливість.

СТ містить одну хромосому 1.043000 вр. Геном кодує приблизно 875 білків, не всі з яких обов'язково експресуються. Крім хромосоми, СТ зазвичай містить позахромосомний генетичний елемент (криптична плазмід) розміром 7493 вр. Плазмід дуже законсервована, зі зміною нуклеотидної послідовності менше ніж на 1%. Методи ампліфікації нуклеїнових кислот (NAAT) перевершили культуру клітин і виявлення антигену для діагностики інфекцій *Chlamydia trachomatis* через їх підвищену чутливість.

Методи ампліфікації нуклеїнових кислот (NAAT) перевершили культуру клітин і виявлення антигену для діагностики інфекцій *Chlamydia trachomatis* через їх підвищену чутливість.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір LUA-PCR.СТ.150 заснований на аналізі в реальному часі, що використовує специфічні Праймери та Проби.

ДНК *Chlamydia trachomatis*, виділену з досліджуваного біологічного зразка на етапі екстракції, ампліфікують за допомогою системи ампліфікації в реальному часі. Ампліфікований продукт виявляють за допомогою проби флуоресцентного контрольного барвника, специфічного для геномної послідовності *Chlamydia Trachomatis*, що часто повторюється (від 1 до 10 разів).

Гетерологічний Внутрішній контроль (IC) служить контролем Екстракції/Ампліфікації для кожного окремо обробленого зразка з метою ідентифікації інгібіторів реакції.

Високопозитивний контроль (CTRL-H) і Низькопозитивний контроль (CTRL-L) надаються як контролю реакції ПЛР.

Д. КОМПОНЕНТИ

Стандартний формат продукту з кодом LUA-PCR.СТ.50 містить реанти для 50 тестів.

Компонент	Маркування та вміст	LUA-PCR.СТ.50 50 тестів
А КОД: ALL/MM5 КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ПРОЗОРИЙ	Майстер-мікс	х 1 флакон/0.825 мл (ml)
В КОД: СТ/СВ КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ:	Ліофілізовані Праймери/Проби	х 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C,

ЖОВТИЙ		зазначеним на етикетці флакона)
С КОД: ALL/С КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЧЕРВОНИЙ	MG Вода	х 2 флакони/1.5 мл (ml)
NTC КОД: ALL/NTC КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: БІЛИЙ	Негативний контроль	х 1 флакон/1.5 мл (ml)
CTRL-H Високопозитивний контроль (10 ⁴ копій/мкл (μl)) КОД: СТ/CTRL-H КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ФІОЛЕТОВИЙ	Ліофілізований Якісний Високопозитивний	х 8 флаконів (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
CTRL-L Низькопозитивний контроль (10 копій/мкл (μl)) КОД: СТ/CTRL-L КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: РОЖЕВИЙ	Ліофілізований Якісний Низькопозитивний	х 8 флаконів (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
І.С. Внутрішній контроль КОД: ALL/ІС КОЛЬОРОВЕ КОДУВАННЯ: ЗЕЛЕНИЙ	Ліофілізований Внутрішній контроль	х 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
Вкладиш інструкції	Інструкція по застосуванню	1

Важлива примітка: За запитом Лабюей може надати реанти для 25, 100, 150 тестів, як зазначено нижче:

1. Компонент А	х1 флакон/0.4 мл (ml)	х2 флакони/0.825 мл (ml)	х3 флакони/0.825 мл (ml)
2. Компонент В	х1 флакон	х4 флакони	х6 флаконів
3. Компонент С	х1 флакон/1.5 мл (ml)	х2 флакони/1.5 мл (ml)	х3 флакони/1.5 мл (ml)
4. NTC	х1 флакон/1.5 мл (ml)	х1 флакон/1.5 мл (ml)	х1 флакон/1.5 мл (ml)
5. IC	х1 флакон	х4 флакони	х6 флаконів
6. CTRL-L	х4 флакони	х4 флакони	х6 флаконів
7. CTRL-H	х4 флакони	х4 флакони	х6 флаконів
8. Інструкція	1	1	1
Кількість тестів	25	100	150
Код	LUA-PCR.СТ.25	LUA-PCR.СТ.100	LUA-PCR.СТ.150

Е. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір LUA-PCR.СТ.150 необхідно зберігати при +2...8 °C (°C). Після розчинення Компонент В (кодування СТДНА/СВ) і Компонент ІС (кодування ALL/ІС) стабільні протягом 4 місяців при -20 °C (°C). Після розчинення компонентів позитивні контролю ВИСОКИЙ і НИЗЬКИЙ (кодовані СТ/CTRL-HIGH, СТ/CTRL-LOW) стабільні протягом 2 тижнів при -20 °C (°C). Якщо компоненти повинні використовуватися лише періодично, їх слід заморожувати в аліквотах, слід уникати повторного розморожування та заморожування. Допускається лише одне розморожування.

Ф. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки (0.5 мкл (μl) < об'єм < 1000 мкл (μl)).
- Набір для екстракції ДНК.
- MG EtOH.
- Термоблок.
- Мікроцентрифуга.
- Штативи для пробірок.
- Стерильні фільтровані наконечники з аерозольним бар'єром.
- Безнуклеазні мікропробірки.
- 0.2 мл (ml) мікропробірки або мікропланшети для ПЛР, рекомендовані виробниками приладів для ПЛР у реальному часі.
- Одноразові рукавички без тальку.
- Термоциклер для ПЛР у реальному часі (*).
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Вортекс або подібні інструменти для змішування.
- PBS.

(*) **Увага:** Дійсне калібрування чистих барвників (файл компонентів Pure Spectra) і фону (файл компонентів фону) має виконуватися регулярно.

G. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Технічний персонал повинен пройти глибоку підготовку щодо використання Термоциклерів у реальному часі, маніпуляції з реагентами молекулярної біології та протоколів ампліфікації ПЛР у реальному часі.
3. Для проведення такого типу аналізу набір необхідно використовувати в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я чи аналогічним органом).
4. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
5. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
6. Необхідно контролювати лабораторне середовище, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікробні агенти, що переносяться повітрям.
7. Компоненти А і В світлочутливі. Захистіть їх від впливу сильного світла.
8. Уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
9. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
10. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
11. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
12. Уникайте перехресного забруднення між зразками, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка.
13. Уникайте перехресного забруднення між реагентами набору, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них.
14. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері
15. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки/плазми людини слід поводитися на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
16. Зберігайте та екстрагуйте зразки окремо від інших реагентів та використовуйте окреме приміщення для роботи з ними.
17. Розчиніть ліофілізовані реагенти з правильною кількістю (зазначеною на етикетках) Компонента С (кодування: ALL/C), що постачається в наборі.
18. Виконуйте всі робочі операції якомога швидше, зберігаючи компоненти на льоду або в охолоджувальному блоці.
19. Робочий процес лабораторії має відбуватися в односпрямованому напрямку, починаючи з Зони екстракції та переходячи до зон Ампліфікації та Аналізу даних. Не повертайте зразки, обладнання та реагенти в зону, де були виконані попередні дії.
20. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
21. Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедур екстракції, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Не допускайте контакту відходів екстракції з відбілювачем.
22. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.

23. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

H. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Мазки з шийки матки та уретри повинні бути зібрані у відповідному транспортному середовищі, яке зберігає нуклеїнову кислоту від бактерій.
2. Для зразків сечі використовуйте перші 20-30 мл (ml) початкового потоку сечі, яка, як вважається, містить найвищу концентрацію діагностично релевантних компонентів.
3. Використовуйте для зразків сечі поліпропіленові пробірки без додавання консервантів.
4. Мазки з уретри, мазки з шийки матки та зразки сечі повинні бути попередньо оброблені перед екстракцією ДНК відповідно до розділу М.
5. Зразки сечі та мазків необхідно транспортувати та зберігати при температурі +2/+8 °C (°C) максимум 3 дні. Для оптимального зберігання зразків ми рекомендуємо розділити їх на кілька аліквот (мінімальний об'єм 100 мкл (µl)) і зберігати замороженими при -20 °C (°C)...-80 °C (°C) протягом максимального періоду 30 днів з моменту відбору зразка. Уникайте повторних циклів заморожування/розморожування.
6. Використовуючи заморожені зразки, розморозьте зразки безпосередньо перед екстракцією, щоб уникнути деградації нуклеїнової кислоти.
7. Зразки мають бути чітко ідентифіковані кодами чи назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів.

I. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Майстер-мікс:

Компонент А. Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі та коротко центрифугуйте, щоб зібрати весь об'єм.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент А чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

Праймери/Проби:

Компонент В.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований Компонент В з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < KТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент В чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.

MG вода:

Компонент С. Готовий до використання.

Негативний Контроль:

NTC. Готовий до використання.

Позитивний Контроль:

Компонент CTRL-H.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований CTRL-H з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < KТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

Компонент CTRL-L.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований CTRL-L з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.

- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

Внутрішній контроль:

I.C.

- Центрифугуйте флакон при 11000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований I.C. з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) < КТ < 25 °C (°C)).
- Перемішайте на вортексі.

L. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. **Мікропіпетки** повинні бути відкалібровані, а також повинно проводитися регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково контактувати зі зразком. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 5%.
2. **Пристрій для екстракції:** Набір LUA-PCR.СТ.150 призначений для використання тільки в комбінації з набором QIAamp DNA Mini з кодом 51306 (QIAGEN) та набором NucleoSpin Blood з кодом 740951 (Macherey Nagel). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання, наданої виробниками.
3. **Термоциклери в режимі реального часу:** Набір LUA-PCR.СТ.150 призначений для використання тільки в поєднанні з Термоциклерами реального часу ABI 7500, програмним забезпеченням SDS версії 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P, програмним забезпеченням MxPro версії 4.01 (Stratagene) та CFX96, програмним забезпеченням CFX manager версія 1.7 (Biorad). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання приладів, наданої виробниками.

M. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовуйте, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтесь, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Перевірте, чи на дні флаконів з ліофілізованими компонентами присутній добре сформований агрегат. Переконайтесь, що при транспортуванні не сталося поломки і не пролило рідини всередині коробки.
3. Розчиніть Ліофілізовані компоненти з відповідною кількістю Компонента С (вода MG), як описано у відповідному розділі (I).
4. Увімкніть Термоциклери, перевірте налаштування та переконайтесь, що використовуєте правильний протокол аналізу.
5. Суворо дотримуйтесь посібника користувача, наданого виробниками, для правильного налаштування термоциклерів для визначення в режимі реального часу.
6. Перевірте, чи встановлені мікропіпетки на необхідний об'єм.
7. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
8. У разі виникнення проблем не продовжуйте тестування і повідомте про це керівника.

N. ПОПЕРЕДНЯ ОБРОБКА ЗРАЗКА

Сеча

- Центрифугуйте при 4500 об/хв (rpm) протягом 10 хвилин.
- Видаліть супернатанти та розчиніть осад у потрібній кількості стерильного PBS залежно від розміру отриманої гранули (0.5-2 мл (ml)).
- Перейдіть до екстракції ДНК.

Мазки

- Центрифугуйте при 4500 об/хв (rpm) протягом 10 хвилин.
- Видаліть супернатанти та розчиніть осад у потрібній кількості стерильного PBS залежно від розміру отриманої гранули (0.5-2 мл (ml)).
- Перейдіть до екстракції ДНК.

O. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче.

O.1 Екстракція ДНК

Крок екстракції геномної ДНК *Chlamydia trachomatis* має проводитися виключно в поєднанні з такими наборами:

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник
Мазки з уретри/Шийки матки та Сеча	Набір QIAamp DNA mini®	51306	QIAGEN™
Мазки з уретри/Шийки матки та Сеча	Nucleospin Blood	740951	MN™

Екстракція геномної ДНК *Chlamydia trachomatis* із зразка **сечі** повинна проводитися кінцевим користувачем відповідно до інструкцій виробника за допомогою таких наборів:

• **Набір QIAamp DNA Mini (QIAGEN)**

Важливі примітки: Протокол «Очищення ДНК з тканини», описаний в Інструкції виробника, повинен застосовуватися з наступними змінами:

1. Почніть протокол з кроку № 2, використовуючи як зразок 200 мкл (µl) ресуспендованих гранул, описаних у розділі M (попередня обробка зразка), замість зразка Тканини.
2. В кроці № 11 використовуйте 100 мкл (µl) Буфера для елюювання замість 200 мкл (µl).

• **Набір NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel)**

Важлива примітка: Дотримуйтесь «Стандартного протоколу очищення ДНК з цільної крові» (Протокол 5.1), описаного в Інструкції виробника, з такими змінами:

1. Почніть протокол з кроку № 1, використовуючи в якості зразка 200 мкл (µl) ресуспендованої гранули сечі, описаної в розділі N (попередня обробка зразка).

Екстракція із зразка **мазка** повинна здійснюватися кінцевим користувачем відповідно до інструкцій виробника з наступними наборами:

• **Набір QIAamp DNA Mini (QIAGEN)**

Важливі примітки: Протокол «Очищення ДНК з тканини», описаний в Інструкції виробника, повинен застосовуватися з наступними змінами:

1. Почніть протокол з кроку № 2a, використовуючи як зразок 200 мкл (µl) ресуспендованих гранул, описаних у розділі M (попередня обробка зразка), замість зразка Тканини.
2. В кроці № 11 використовуйте 50 мкл (µl) Буфера для елюювання замість 200 мкл (µl).

• **Набір NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel)**

Важлива примітка: Дотримуйтесь «Стандартного протоколу очищення ДНК з цільної крові» (Протокол 5.1), описаного в Інструкції виробника, з такими змінами:

1. Почніть протокол з кроку № 1, використовуючи в якості зразка 200 мкл (µl) ресуспендованої гранули сечі, описаної в розділі N (попередня обробка зразка).
2. В кроці № 6 «Елюювати високоочищену ДНК» використовуйте 50 мкл (µl) Буфера для елюювання замість 100 мкл (µl).

ДНК, зібрану із зразків, не використану під час аналізу, слід зберігати замороженою (-20 °C (°C)/-80 °C (°C)).

Важлива примітка: ІС набору LUA-PCR.СТ.150 можна використовувати в процедурі ізоляції як контроль екстракції.

Значення Внутрішнього Контролю Ст для негативних зразків використовується для оцінки того, чи була процедура екстракції ДНК виконана правильно (див. розділ R).

Для цього застосування додайте 10 мкл (µl) ІС до буфера для лізису та суміші зразків і продовжуйте, дотримуючись інструкції з експлуатації, наданої виробником Набору для екстракції.

0.2 Постановка реакції

Набір **LUA-PCR.CT.150** призначений для використання виключно в комбінації з ABI 7500, програмним забезпеченням SDS версії 1.3.1 (Applied Biosystems), Mx3000P, програмним забезпеченням MxPro версії 4.01 (Stratagene), та CFX96, програмним забезпеченням CFX manager версії 1.7 (Biorad).

0.2.1 Підготовка ПЛР

Важливо: Приклад схеми розподілу наведено в Розділі Р. Будь ласка, зверніться до нього перед початком операцій, описаних нижче.

- Підготуйте компоненти, як описано в Розділі І.
- Підготуйте необхідну кількість реакційних пробірок або 96-лунковий реакційний планшет для досліджуваних зразків та для Позитивних контролів (підготовлених, як описано в розділі І).

Важлива примітка: Використовуйте лише оптичні пробірки або мікропланшети, рекомендовані виробниками термоциклерів для визначення в режимі реального часу.

- Врахуйте, що зразки, якщо це можливо, повинні бути аналізовані в двох примірниках.
- Включіть принаймні 1 пробірку/лунку для NTC (негативний контроль).
- Приготуйте **Ампліфікаційну Суміш** для **Зразків, NTC та позитивних контролів (CTRL-H, CTRL-L)**, як показано в таблиці нижче:

Приготування Ампліфікаційної суміші (І.С. як Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		x1	x12
A	Майстер-Мікс	12.5 мкл (μl)	150 мкл (μl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (μl)	24 мкл (μl)
I.C.	Внутрішній контроль	0.5 мкл (μl)	6 мкл (μl)
Загальний об'єм		15 мкл (μl)	180 мкл (μl)

Важлива примітка: Якщо Внутрішній контроль був доданий під час процедури виділення ДНК, приготуйте **Ампліфікаційну суміш** для **Зразків, NTC та позитивних контролів (CTRL-H, CTRL-L)**, як показано в таблиці нижче:

Приготування Ампліфікаційної суміші (І.С. як Екстракційний/Ампліфікаційний контроль)

Кількість реакцій		x1	x12
A	Майстер-Мікс	12.5 мкл (μl)	150 мкл (μl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (μl)	24 мкл (μl)
C	Вода MG	0.5 мкл (μl)	6 мкл (μl)
Загальний об'єм		15 мкл (μl)	180 мкл (μl)

0.2.2 Процедура ампліфікації

- Додайте 15 мкл (μl) Ампліфікаційної суміші в кожну реакційну пробірку або лунку для мікропланшета.
- Додайте 10 мкл (μl) **Зразків, NTC, CTRL-H та CTRL-L** до реакційних пробірок.
- Щільно закрийте реакційні пробірки.
- Коротко центрифугуйте реакційні пробірки при 2000 об/хв (rpm).
- Не залишайте реакційні пробірки при кімнатній температурі (КТ) більше ніж на 30 хвилин і під впливом світла (накрийте пробірки).
- Завантажте реакційні пробірки в Тримач Термоблоку Термоциклера для визначення в режимі реального часу.
- Після операцій налаштування, описаних у Розділі О3 (Програмування приладу), запустіть Термоциклер.

Важлива примітка: Ліофілізовані компоненти після розчинення в Компоненті С (вода MG) стабільні не більше 3 годин при зберіганні на льоду або при температурі 2-8 °C (°C). Невикористаний об'єм Компонента В, CTRL-H, CTRL-L та I.C. можна заморожувати при -20 °C (°C) і використовувати, як описано в Розділі Е.

0.3 Програмування приладу

Для програмування приладу зверніться до Інструкції з експлуатації приладу, наданої виробниками.

Важлива примітка: Для Mx3000P встановіть «Налаштування підсилення фільтра»: **ROX = x1, FAM = x8, JOE = x1**. (див. Інструкцію з експлуатації програмного забезпечення MxPro™ QPCR, стор.41).

0.3.1 Температурний профіль

Температурний профіль наведено в таблиці нижче:

Крок	Цикл	Температура	Час
1	1	50 °C (°C)	2 хвилини
2	1	95 °C (°C)	10 хвилин
3	50	95 °C (°C)	15 секунд
		60 °C (°C) (*)	1 хвилини

ВАЖЛИВА ПРИМІТКА: (*) крок для збору даних у реальному часі.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Зверніть увагу, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з правильним Температурним Профілем, дотримуючись посібника користувача, наданого виробником приладу.

0.3.2 Вибір Детекторів

Детектори мають бути вибрані відповідно до того, що описано в таблиці нижче, і відповідно до інструкцій з експлуатації термоциклерів реального часу, що використовуються.

Детектори	СТ	Внутрішній Контроль (IC)	Пасивний референс
Прилад	Флуорофор	Флуорофор	
ABI 7500 SDS	FAM - нема	JOE - нема	ROX
STRATAGENE Mx3000P®	FAM	JOE	ROX
BIORAD CFX96®	FAM	VIC	-

Відповідно до Інструкції з експлуатації Термоциклера для визначення в режимі реального часу (ABI 7500 Applied Biosystems, Mx3000P Stratagene, BioRad CFX96), виберіть тип зразка та завантажте детектори, як зазначено в таблиці нижче:

Тип зразка	CTRL	ЗРАЗОК (невідомий)	NTC
	Детектори	Детектори	Детектори
ВСІ ПРИЛАДИ	СТ IC (опційно)	СТ IC	СТ IC

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Слідкуйте за тим, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з відповідними налаштуваннями згідно з посібником користувача, наданого виробником.

Р. СХЕМА АНАЛІЗУ

Нижче наведено приклад схеми розподілу для Якісного аналізу:

Мікропланшет або пробірки

	1	2	3	
A	CTRL-H 10 ⁴ копій/мкл (μl)	Зразок 6		
B	CTRL-L 10 копій/мкл (μl)	Зразок 7		
C	NTC	Зразок 8		
D	Зразок 1	Зразок 9		
E	Зразок 2	Зразок 10		
F	Зразок 3	Зразок 11		
G	Зразок 4	Зразок 12		
H	Зразок 5	Зразок 13		

Легенда: NTC = Негативний Контроль; CTRL-H, CTRL-L = Позитивний контроль ДНК Chlamydia trachomatis, Зразок 1, 2, 3 і т. д. = Зразки, що оцінюються.

Q. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Q.1 Налаштування перед початком аналізу

Перш ніж почати інтерпретацію даних:

- Встановіть «Baseline/Початкові умови» (рівень фонові флуоресценції), як зазначено нижче:

«Baseline/Початкові умови»	
ABI™PRISM® 7500 SDS	Автоматично встановлені початкові умови
BIORAD™ CFX96®	Автоматично розраховані початкові умови
STRATAGENE™ Mx3000P®	Адаптивні початкові умови (Не використовуйте алгоритм Mx4000 v1.00 - v3.00)

- Встановіть вручну «Threshold/Popriг» флуоресценції FAM/JOE/VIC.

FAM «Threshold/Popriг» флуоресценції	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.13
STRATAGENE™ Mx3000P®	0.13
BIORAD™ CFX96®	300

JOE/VIC «Threshold/Popriг» флуоресценції	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.08
STRATAGENE™ Mx3000P®	0.02
BIORAD™ CFX96®	150

Q.2 Аналіз даних

Перевірка на Високому/Низькому позитивних контролях проводиться щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають їхні значення Ct очікуваним і зазначеним у таблиці нижче.

ABI™PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P® - BIORAD™ CFX96®	
Перевірка FAM	Вимоги
CTRL-H	$22 \leq Ct$ (Пороговий цикл) ≤ 26
CTRL-L	$32 \leq Ct$ (Пороговий цикл) ≤ 36

R. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Передбачається, що для кожного зразка флуоресценція FAM (позитивне/негативне значення Ct) і флуоресценція Внутрішнього Контролю JOE підтверджують виявлення ДНК СТ, як описано в таблиці нижче:

C.trachomatis FAM	Внутрішній Контроль JOE	Результат Аналізу
ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	$20 < Ct < 40$	ВІРНО
	$Ct > 40$ або невизначено	ВІРНО*
ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	$20 < Ct < 40$	ВІРНО
	$Ct > 40$ або невизначено	НЕДІЙСНИЙ**

*Висока початкова концентрація ДНК C.trachomatis (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО чи ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного Сигналу внутрішнього контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів.

**Проблеми можуть виникнути на етапі ампліфікації (неефективна ампліфікація або її відсутність) або під час етапу екстракції (наявність інгібіторів або початковий зразок, що містить недостатню кількість клітин), що призводить до неправильного результату. Процедурі тестування необхідно повторити, починаючи з етапу Екстракції, використовуючи свіжий зразок, отриманий від пацієнта.

Результати, отримані за допомогою набору LUA-PCR.CT.150, повинні бути інтерпретовані відповідальним лабораторії з урахуванням клінічних симптомів пацієнтів та інших лабораторних маркерів інфекції.

Можливі наступні результати:

Таблиця усунення несправностей

	FAM	JOE	Результат	ПЕРЕВІРИТИ
ЗРАЗОК невідомий	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Позитивний</i>	ВАЖЛИВО: Висока початкова концентрація ДНК СТ (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО чи ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу Внутрішнього Контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів.
ЗРАЗОК невідомий	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилка в процедурі або неправильне функціонування приладів	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення СТ і JOE для І.С. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки;

				7. щоб процедура екстракції була виконана правильно.
ЗРАЗОК невідомий	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Негативний</i>	
CTRL-H/CTRL-L	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	ВАЖЛИВО: Висока початкова концентрація ДНК СТ (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО чи ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу Внутрішнього Контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів.
CTRL-H/CTRL-L	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення СТ і JOE для І.С. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки.
CTRL-H/CTRL-L	-	+	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення СТ і JOE/VIC для І.С. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався.
NTC	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	
NTC	+	+/-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб робоче місце та інструменти незаражували через регулярні проміжки часу; 4. що набір зберігався належним чином.

Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок у судженнях та невірних інтерпретацій.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до інформаційного центру, необхідно бути уважними, щоб уникнути помилкової передачі даних.

Якщо виникає одна чи інша проблема, описана у таблиці вище, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

S. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена відповідно до того, що повідомляється у Внутрішніх Технічних Специфікаціях або ITS.

Оцінку ефективності проводили в лабораторіях на матеріалах, наданих референсними клінічними лабораторіями.

S.1 АНАЛІТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ

Аналітична чутливість може бути виражена як **Межа Виявлення**.

Межа виявлення (LOD): Це найменша кількість цільового значення, яку може виявити система із заданою ймовірністю.

Для тестів NAT це виражається як найменша концентрація аналіту, яка за багаторазової перевірки дає позитивний результат.

Межа виявлення (LOD) визначається шляхом тестування серійних розведень зразка, що містять відомі концентрації аналіту.

LOD - це найнижча концентрація аналіту, яку можна постійно виявляти (наприклад, $\geq 95\%$ зразків у звичайних лабораторних умовах).

Для набору LUA-PCR.CT.150 **LOD** було визначено шляхом тестування серійних розведень 1:2 (8 повторів для трьох різних запусків) плазміді, що несе послідовність вірусної мішені.

Результати аналізували за допомогою аналізу **Probit**, щоб визначити межу виявлення на рівні 95%.

LOD був підтверджений під час тестування на CFX96RTS відповідного розведення в 24 повторях.

Результати є наступними:

Межа виявлення LOD (p=0.05)	
ABI™PRISM® 7500 SDS	0.53 копії/мкл (µl)
STRATAGENE™ MX3000P®	0.53 копії/мкл (µl)
BIORAD™ CFX96® RTS	0.53 копії/мкл (µl)

Важлива примітка: Ціллю є послідовність плазміди *Cryptic*, яка повторюється 1-10 разів у геномі *Chlamydia trachomatis*.

5.2 АНАЛІТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Аналітична специфічність полягає у здатності методу виявляти тільки послідовність цільових ДНК.

Аналітичну специфічність аналізу ДНК СТ вивчали наступним чином:

1. Набір праймерів/проб було обрано, аналізуючи цільову послідовність геному за допомогою відповідного програмного забезпечення (LionSoft v.1.0 від Biotools і Primer Express v.3.0 від Applied Biosystem Inc.).
2. Набір праймерів/проб і цільова послідовність геному контролюються програмним забезпеченням «BLAST», щоб перевірити, чи будь-яка з нуклеотидних послідовностей, депонованих у світових геномних банках, має гомологію з *Chlamydia trachomatis*, та програмним забезпеченням «ClustalX», щоб порівняти цільові послідовності геному різних генотипів *Chlamydia trachomatis*.
3. Специфічність була покращена шляхом підбору жорстких умов реакції.
4. Геному ДНК, виділену з бактерій, які можуть інтерферувати з *Chlamydia trachomatis*, було отримано від American Type Culture Collection (ATCC) і Vircell та Контроль Якості Для Молекулярної Діагностики (QCMD) і протестовано.

Результати представлені в наступній таблиці:

Організм	Результат
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	негативний
<i>Chlamydia psittaci</i>	негативний
<i>Candida albicans</i>	негативний
<i>Candida glabrata</i>	негативний
<i>Mycoplasma hominis</i>	негативний
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	негативний
<i>Acinetobacter spp</i>	негативний
<i>Escherichia coli</i>	негативний
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	негативний
<i>Streptococcus pyogenes</i>	негативний
<i>Proteus mirabilis</i>	негативний
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	негативний

5.3 ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ

5.3.1 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність - це ймовірність того, що пристрій дає негативний результат за відсутності цільового маркера. Отже, **справжній негативний** зразок - це зразок, який, як відомо, є негативним для цільового маркера та правильно класифікований пристроєм.

Цей параметр досліджували шляхом дослідження 49 негативних зразків ДНК *C. trachomatis* (30 сечі та 19 мазків з шийки матки) за допомогою методу екстракції тканини NucleoSpin.

Крім того, за допомогою набору NucleoSpin Blood було очищено 9 негативних зразків сечі та 1 негативний мазок із шийки матки.

СПРАВЖНІ НЕГАТИВНІ_Тканина MN	49
СПРАВЖНІ НЕГАТИВНІ_Кров MN	10
ХИБНО ПОЗИТИВНІ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	59
СПЕЦИФІЧНІСТЬ %	100

На основі отриманих результатів розрахована Діагностична Специфічність системи становить $\geq 99\%$.

5.3.2 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість - це ймовірність того, що прилад дає позитивний результат при наявності цільового маркера. Отже, **справжній позитивний** зразок - це зразок, який, як відомо, є позитивним для цільового маркера і правильно класифікований пристроєм.

Для набору LUA-PCR.СТ.150 цей параметр досліджували шляхом дослідження 12 позитивних зразків ДНК *C. trachomatis* мазків із шийки матки та 7 позитивних зразків ДНК *C. trachomatis* сечі за допомогою методу екстракції тканин NucleoSpin.

Крім того, за допомогою набору NucleoSpin Blood було очищено 6 зразків ДНК *C. trachomatis* (4 зразки сечі та 2 зразки мазка з шийки матки).

СПРАВЖНІ ПОЗИТИВНІ_Тканина MN	12
СПРАВЖНІ ПОЗИТИВНІ_Кров MN	6
ХИБНО НЕГАТИВНІ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	18
СПЕЦИФІЧНІСТЬ %	100

На основі отриманих результатів розрахована Діагностична Чутливість системи становить **100%**.

Діагностична Чутливість	100%
Діагностична Специфічність	> 99.5%

5.4 ТОЧНІСТЬ

Точність показує ступінь надійності системи. Кожній процедурі вимірювання властива випадкова зміна, яка називається «випадкова помилка». Випадкова помилка не має числового значення, але визначається дисперсією вимірювання як стандартне відхилення (DevST) і коефіцієнт варіації (CV%). Зазвичай точність аналізу відноситься до узгодження між повторними вимірюваннями одного і того ж матеріалу.

У наборі LUA-PCR.СТ.150 **точність** виражалася як варіабельність в межах аналізу та мінливість між аналізами. 8 повторів CTRL-H і CTRL-L були перевірені в одному запуску (в аналізі) і в трьох різних запусках (між аналізами).

Потім на основі отриманих результатів розраховували варіабельність в межах і між аналізами.

За відсутності встановлених міжнародних параметрів ми визначили наступне значення прийнятності для набору LUA-PCR.СТ.150:

Коефіцієнт варіації в межах аналізу (CV%) $\leq 10\%$.

Коефіцієнт варіації між аналізами (CV%) $\leq 10\%$.

Т. ОБМЕЖЕННЯ

Користувачеві цього набору радимо уважно прочитати та зрозуміти цю інструкцію. Для отримання достовірних результатів тесту необхідно суворо дотримання протоколу. Зокрема, точне піпетування зразків і реагентів, застосування правильного робочого процесу разом із ретельним програмуванням кроків термоциклу є важливими для точного та відтворюваного виявлення ДНК СТ.

Визначення ДНК СТ у зразку пацієнта має великі медичні, соціальні, психологічні та економічні наслідки.

Рекомендується розглядати конфіденційність, відповідне консультування та медичну оцінку як суттєвий аспект послідовності тестування.

5. СИМВОЛИ

	Код продукту		Температура зберігання
	Прилад для діагностики in vitro		Дивіться інструкцію з використання
	Номер лоту		Виробник
	Термін придатності		Кількість тестів
 UA.TR.116	Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером призначеного органу з оцінки відповідності, який був залучений на етапі контролю виробництва		Дата виготовлення

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю, схваленої Уповноваженим органом з оцінки відповідності. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови відповідності технічним регламентам та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК:

ТОВ «ЛАБЮЕЙ»

Україна, 76018

м. Івано-Франківськ, вул. Петлюри, 25

Моб.: +38 (067) 000-20-22

E-mail: info@labua.com.ua



UA.TR.116