



ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

НАБІР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

IVD

REF AVT-109

Σ 100



ТОВ «АСТРАВІР ТЕКНОЛОДЖІ»
61011, Україна, м. Харків,
вул. Полтавський шлях 6, оф.25
+380990325214
info@astravirtech.com.ua
www.astravirtech.com.ua

Редакція 1 від 08.03.2022 р.

1. Призначення

Цей набір призначено для клінічної ПЛР-діагностики *Chlamydia trachomatis*. Набір дозволяє проводити *in vitro* детекцію ДНК-последовностей у таких зразках, як зішкріби з уретри, цервікального каналу, заднього зводу піхви.

Сфера використання - *in vitro* діагностика (IVD)

2. Принцип аналізу

Виявлення ДНК здійснюється шляхом постановки ПЛР в реальному часі. З цією метою до набору включена термостійка ДНК-полімераза Taq із гарячим стартом. Специфічні сайти для детекції локалізуються у геномі *Chlamydia*. Валідність отриманих результатів забезпечується мультитаргетністю суміші праймерів, а також наявністю внутрішнього контролю (IC) та позитивного контрольного зразка (PC).

3. Специфікації

Склад: 100 реакцій / набір

Чутливість: 98,1 %

Специфічність: 98,5 %

Нижня межа аналітичної чутливості: 10 копій / реакцію

Час ампліфікації / повного проходження процедури: 1 год. 15 хв. / 2 год. 25 хв.

4. Склад набору

Назва реагенту	Наклейка на пробірці	Об'єм	Примітка
ПЛР Мастер Мікс	4X червона	500 µl	Базовий розчин для проведення ПЛР, містить суміш дНТФ, Mg ²⁺ і т.д.
Суміш праймерів	жовта	500 µl	Містить праймери, специфічні до цільових последовностей у геномі <i>Chlamydia</i>
Позитивний контрольний зразок (PC)	PC чорна	100 µl	Слугує для загального контролю постановки
TE буферний розчин	TE біла	500 µl	Ультра-чистий, вільний від нуклеаз розчин

5. Запобіжні заходи

Всі реагенти, що входять до складу набору, призначені для діагностики «*in vitro*».

Робота повинна проводитися в лабораторії, що виконує молекулярно-біологічні (ПЛР) дослідження клінічного матеріалу на наявність збудників інфекційних хвороб, з дотриманням державних санітарних норм і правил ДСП №9.9.5-080-2003 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю», ДСанПіН 9.9.5-153-2008 «Організація роботи

лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами».

При роботі завжди слід виконувати наступні загальні вимоги:

- Розглядати всі досліджувані зразки як інфекційно-небезпечні.
- Прибирати і дезінфікувати розлиті зразки або реактиви, використовуючи відповідні дезінфікуючі засоби.
- Лабораторний процес має проводитись в одному напрямку (виділення → детекція). Аналіз проводиться в окремих приміщеннях (зонах). Роботу слід починати в Зоні Виділення, продовжувати в Зоні Ампліфікації і Детекції. Не повертати зразки, устаткування і реактиви в зону, в якій була проведена попередня стадія процесу.



УВАГА! При видаленні відходів після ампліфікації (пробірок, що містять продукти ПЛР) неприпустимо відкривання пробірок і розбризування вмісту, оскільки це може привести до контамінації продуктами ПЛР лабораторної зони, устаткування і реагентів.

- Застосовувати набір суворо за призначенням, згідно цієї інструкції.
- Допускати до роботи з набором тільки спеціально навчений персонал.
- Не використовувати набір після закінчення терміну придатності.
- Використовувати всі необхідні ЗІЗ.
- Уникати контакту реагентів даного набору зі шкірою, очима і слизовими оболонками. При контакті негайно промити уражене місце водою і звернутися за медичною допомогою.

6. Матеріали та обладнання, необхідні для використання набору

- RT-термоциклер (планшетний, напр. Bio-Rad CFX-96; роторний, напр. Rotor-Gene 6000; їхні аналоги).
- Центрифуга з прискоренням не менше 13,000 g.
- Вортекс будь-якої моделі.
- ПЛР бокс з УФ-лампю.
- Рукавички одноразові без тальку (латексні або нітрилові).
- Дозатори на 1-20, 20-200 і 200-1000 μL .
- Стерильні наконечники з фільтрами на 20, 200 і 1000 μL .
- Мікроцентрифужні пробірки 1,5 mL.
- Мікропробірки з прозорими кришками 0,2 mL.
- Транспортне середовище для протекції ДНК/ДНК.
- Набір для виділення нуклеїнових кислот (на сорбенті або афінних мембранах).

7. Вимоги до забору зразків та пробопідготовки

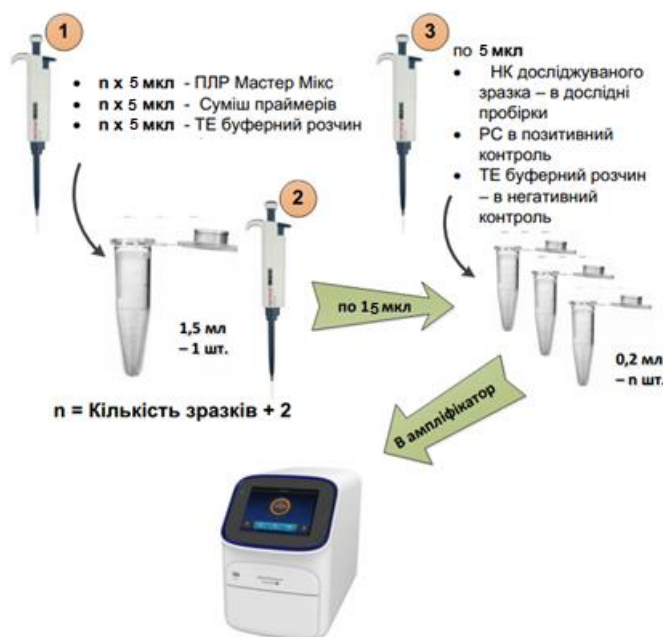
7.1. Клінічний матеріал. Отримання зразків з організму пацієнта проводиться згідно Методичних рекомендацій «Порядок забору, транспортування та зберігання

матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції» МОЗ України, (Наказ МОЗ №662 від 30.07.2013, див. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0662282-13/card2#Card>).

Після забору біологічний матеріал має зберігатися за температури, вказаної в Методичних рекомендаціях МОЗ щодо цього типу клінічного матеріалу, у стерильному й ретельно закритому лабораторному посуді. Транспортування клінічного зразка має проводитись у лізуючому транспортному середовищі.

7.2. Екстракція ДНК. Процедуру лізису біологічного зразка, виділення з нього тотальної ДНК та її очистки проводять за допомогою відповідних комерційних наборів реагентів.

8. Підготовка до проведення RT-ПЛР.



УВАГА! Внесення ТЕ буфера в пробірку з негативним контролем є обов'язковою умовою коректної роботи NC.

а) Повільно, за кімнатної температури (18-23° C) розморозити реагенти набору і розчин ДНК з клінічних зразків. Перемішати вміст кожної мікроцентрифужної пробірки на вортексі та відцентрифугувати протягом 2-3 с для усунення крапель і бульбашок.

б) Встановити у штативі в попередньо стерилізованому ПЛР боксі порожні пробірки:

- **1 шт.** об'ємом **1.5 mL** – для приготування загального стоку реакційної суміші.
- **n** мікроцентрифужних пробірок об'ємом **0.2 mL** з прозорими кришками – для подальшого завантаження у термоциклер, де n – кількість лунок, які будуть зайняті в термоциклері, тобто: загальна кількість зразків, а також 2 додаткові пробірки, призначені для негативного контролю (NC) та позитивного контролю (PC).



УВАГА! Для завантаження в термоциклер **iCycler iQ5** BioRad рекомендується використовувати мікропробірки з білого непрозорого пластику з прозорими кришками, а для завантаження в інші термоциклери – з прозорого пластику.

в) Розрахувати необхідний об'єм реакційної суміші, виходячи з того, що для проведення 1 реакції потрібно взяти **5 µL розчину з праймерами**, **5 µL суміші Мастер Мікс**, **5 µL ТЕ буферу**, враховуючи загальну кількість клінічних зразків, 1

позитивний контроль (PC) і 1 негативний контроль (NC). Виготовити загальний сток реакційної суміші згідно з цим прописом, ретельно перемішати його на вортексі й відцентрифугувати впродовж **2-3 сек** для усунення крапель і бульбашок.

г) Розподілити реакційну суміш порціями по **15 µL** по підготовлених раніше пробірках об'ємом **0.2 mL**. Промаркувати, **не затуляючи написом прозорої кришки** (напр. на згинах кришок).

д) Внести у пробірки об'ємом **0.2 mL** по **5 µL розчину очищеної ДНК** з клінічних зразків після екстракції. В дві окремі пробірки, залишені під контролі постановки, внести **5 µL позитивного контрольного зразка (PC)** і **5 µL ультрачистого ТЕ буферу** в якості негативного контролю (NC).



УВАГА! Робота з ДНК має проводитися швидко для уникнення її деградації.

е) Встановити пробірки в лунки термоциклера. Закрити кришку приладу.

9. Налаштування термоциклера.

9.1. Загальний протокол ампліфікації. При використанні будь-якої моделі термоциклера слід дотримуватися наступного температурного режиму при проведенні зворотної транскрипції / ампліфікації цільових фрагментів НК:

Стадія 1 («гарячий старт» ДНК-полімерази): **95° C** впродовж **12 хв.**

Стадія 2 (ампліфікація цільової послідовності), **5 циклів:**

Крок 1: **95° C** впродовж **5 сек.**

Крок 2: **60° C** впродовж **10 сек**

Крок 3: **72° C** впродовж **20 сек**



Стадія 3 (ампліфікація цільової послідовності), **40 циклів:**

Крок 1: **95° C** впродовж **5 сек.**

Крок 2: **60° C** впродовж **10 сек** (*детекція відбувається на цьому етапі*).

Крок 3: **72° C** впродовж **20 сек**

Детекція флуоресцентного сигналу відбувається за температури **60° C** за двома каналами, зокрема:

- за каналом **FAM** виявляють специфічні послідовності *Chlamydia trachomatis*
- за каналом **Sy5** – внутрішній контроль.

Детальні інструкції щодо налаштування обладнання від різних виробників під наведений вище протокол описано далі.

9.2. Налаштування устаткування Bio-Rad CFX-96.

а) Після увімкнення приладу запустити програму «**CFX Manager**»

б) Натиснути кнопку «**Create a new run**».

в) У вікні, що відкрилося, вибрати вкладку **«Protocol»** і натиснути **«Create new»**. Відкриється вікно **«Protocol Editor»**, у якому необхідно задати об'єм реакційної суміші (**Sample volume**) як **20 µL** і прописати протокол ампліфікації, наведений у пп. 7.1.



ПРИМІТКА. У випадку, якщо обладнання вже використовувалося з цією реагентною системою, слід перейти за директорією **File > Repeat an Experiment** і вибрати файл останньої постановки.

г) Перейти на вкладку **«Plate»** й натиснути кнопку **«Create New»**. Відкриється вікно **«Plate Editor»**, де необхідно в полі **«Load»** обрати канали детекції флуоресцентного сигналу **FAM** та **Cy5**, а також внести у відповідні лунки номери і/або назви зразків, в т.ч. контрольних.

) Натиснути кнопку **OK**, зберегти файл і запустити процес ампліфікації.

9.3. Налаштування устаткування Corbett Rotor-Gene 6000.

а) У основному меню програми натиснути кнопку **«New»**, після чого обрати шаблон **«Advanced»**, виділити **Dual Labeled Probe / Hydrolysis Probes (TaqMan)** і натиснути кнопку **«New»**.

б) У вікні, що відкрилося, вибрати використовуваний ротор (на 36 / 72 лунки), натиснути кнопку **«Next»**.

в) У вікні, що відкрилося, вибрати чи завдати оператора, вказати об'єм реакційної суміші (**Sample volume**) як **20 µL**, натиснути кнопку **«Next»**.

г) У вікні, що відкрилося, прописати протокол ампліфікації, наведений у пп. 9.1.

д) У розділі **«Channel Setup»** натиснути кнопку **Gain Optimization**, обрати канали **Green** (відп. FAM) та **Red** (відп. Cy5), призначити для них калібрування перед першим вимірюванням (кнопка **«Perform Calibration Before 1st Acquisition / Perform Optimisation Before 1st Acquisition»**). Натиснути кнопку **«Close»**, а після цього – кнопку **«Next»**.

е) Запустити ампліфікацію кнопкою **«Start run»**, зберегти файл експерименту на диску, заповнити таблицю зразків.

9.4. Налаштування устаткування ABI Prism 7500.

а) Відкрити вікно **«Settings»**, пов'язати виставлені в приладі зразки із відповідними категоріями в програмному забезпеченні.

б) Виставити канали детекції **FAM** та **Cy5** у полях **«Reporter»**, поля **«Quencher»** можна лишити незаповненими або прописати **BHQ**. Поле **«Passive reference»** лишити незаповненим.

в) Відкрити вікно **«Instrument»** і прописати протокол ампліфікації, наведений у пп. 7.1.

г) Зберегти файл на диску й запустити процес ампліфікації.

9.5. Налаштування устаткування BioRad IQ-5.

а) Ввімкнути прилад, запустити програму **iCycler iQ5**.



УВАГА! Перед початком роботи прилад має бути прогрітий **не менше 15 хв.**

б) Увійти в режим створення нового протоколу ампліфікації за допомогою кнопки **«Create new»** в модулі **«Workshop»**.

в) У вікні, що відкрилося, задати параметри ампліфікації.



УВАГА! Критичною особливістю роботи цієї реагентної системи з приладом IQ-5 є **подовжений період детекції сигналу** (Стадія 3, Крок 2) під час гібридизації праймерів за температури 58° С. На відміну від інших моделей термоциклерів, на цьому устаткуванні даний етап має тривати не 10 сек, а **25 сек**. У протилежному випадку збір даних не відбудеться.

г) Створити новий планшет зразків (**«Plate Setup»**). Задати схему розташування пробірок в планшеті.

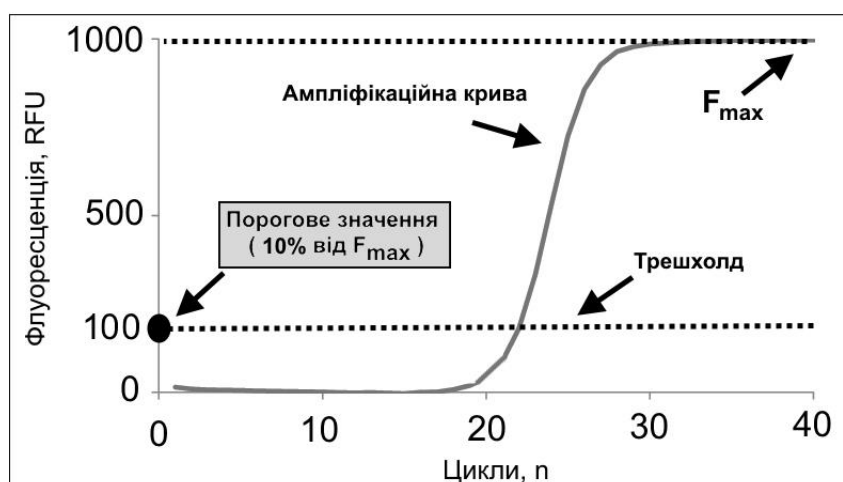
д) У вікні, що відкрилося, всі клінічні зразки позначити як **«Unknown»**, для всіх зразків задати вимір флюоресценції по каналах **FAM/Green** та **Cy5/Red**.

е) Задати об'єм реакційної суміші (**«Sample Volume»**) як **20 мкл**, тип кришок (**«Seal Type»**), тип пробірок (**«Vessel Type»**). Ампліфікацію необхідно проводити з використанням такого ж типу пластику, в якому проводилося калібрування приладу. Зберегти схему планшета.

є) Запустити термоциклер у роботу за допомогою кнопки **«Run»**. У вікні, що відкрилося, зазначити **«Use Persistent Well Factors»**, натиснути кнопку **«Begin Run»** і зберегти експеримент.

10. Інтерпретація результатів

10.1. Визначення трешхолда. Процедура аналізу даних, отриманих за допомогою цієї діагностичної системи, передбачає визначення порогового значення флуоресценції (**threshold**), спираючись на максимальне значення флуоресценції (F_{max}), яке спостерігається на фазі плато ампліфікаційної кривої **для позитивного контрольного зразка**.



Зокрема, трешхолд має бути заданий як **10% від чисельного значення F_{max} у РС** для всієї відповідної постановки, але окремо по кожному з каналів детекції **FAM** і **Sy5**. Значення трешхолда має бути розраховане за допомогою програмного забезпечення, яке використовується в лабораторії, згідно з інструкціями виробника.

10.2. Контроль постановки РТ-ПЛР. Перед початком аналізу основного масиву даних, отриманих в постановці, необхідно оцінити загальну якість її проведення по позитивному (РС) та негативному (NC) контрольним зразкам. Значення C_t , які свідчать про валідність отриманих результатів, мають бути наступними:

	FAM	Sy5
РС	≤ 35	≤ 35
NC	Відсутній	Відсутній



УВАГА! Важливим критерієм якості проведення реакції також слугує S-подібна форма кривих ампліфікації. Ті криві, які не відповідають цьому критерію, мають бути визнані **невалідними**. Це стосується як контрольних, так і дослідних зразків.

10.3. Контроль проходження ампліфікації. Критерієм валідності даних, отриманих по кожному зразку, є наявність у ньому **амплікону внутрішнього контролю**, який детектується по каналу **Сu5**. Відсічне значення (cut-off value) C_t для ІС дорівнює **35 циклам**.



УВАГА! Якщо продукт, який детектується по каналу **Сu5**, відсутній або має **$C_t > 35$ циклів**, результат має бути визнаний невалідним і постановку з цим зразком необхідно повторити, починаючи з етапу виділення. Винятком є результат, коли по каналу **FAM** детектується висока копійність

ДНК (див. нижче).

10.4. Аналіз даних від клінічних зразків. Інтерпретацію даних, отриманих за допомогою цієї реагентної системи, слід проводити згідно з відсічними значеннями C_t , наведеними у таблиці:



УВАГА! Результати ПЛР-аналізу є лише частиною даних, які слугують за основу для постановки остаточного діагнозу. Після їх отримання вони мають бути передані лікарю, який використовує їх разом з іншими клінічними даними для винесення комплексного висновку.

FAM	Сu5	Інтерпретація
≤ 40	Будь-які дані	Зразок позитивний , ІС може бути відсутній через високе навантаження збудником
Відсутні або > 40	≤ 35	Зразок негативний
Відсутні або > 40	> 35	Результат невалідний , необхідне повторення процедури, починаючи з екстракції ДНК

11. Транспортування і зберігання

Реагенти набору мають зберігатися та транспортуватись за температури **мінус 20±5°C**. Всі компоненти лишаються стабільними до закінчення терміну придатності, що складає **12 місяців** з дати виготовлення, в разі дотримання рекомендованих умов зберігання.




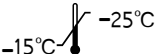








УВАГА! Для уникнення пошкодження ферментів, які входять до складу набору **категорично забороняється** транспортування та зберігання набору за температури **нижчої за мінус 25 °C**.

12. Технічна підтримка

У разі виникнення будь-яких технічних проблем при використанні набору звертайтеся до спеціалістів підприємства-виробника – компанії ТОВ «АСТРАВІР ТЕКНОЛОДЖІ». Рекламації на якість наборів надсилайте підприємству-виробнику. У випадку порушення умов зберігання, транспортування та схеми постановки аналізу з вини споживача рекламації розглядаються як необґрунтовані.

13. Пояснення до символів

	Виробник
	Кількість досліджень
	Медичний виріб для діагностики IN VITRO
	Температурне обмеження
	Дата виробництва (формат РРРР-ММ-ДД)
	Використати до (формат РРРР-ММ-ДД)
	Номер серії
	Номер за каталогом
	Ознайомлення з інструкціями для використання
	Засторога