«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«23» _____ 2022 г.
М.П.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для выявления ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса
методом полимеразной цепной
реакции в режиме реального времени
(РеалБест ДНК МВТС
(форма 1))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени **«РеалБест ДНК МВТС»** предназначен для выявления ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis complex*), который включает в себя виды микобактерий, вызывающих туберкулёз у человека (*M. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. microti, M. africanum*), выделенных из клинических образцов, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» *(фирма «Corbett Research», Австралия)*, «Rotor-Gene Q» *(фирма «Qiagen», Германия*), так и планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналогами.

Набор реагентов **«РеалБест ДНК МВТС»** может быть применен для анализа клинического материала: плазмы крови, биоптатов, ликвора, мочи, бронхоальвеолярного лаважа, мокроты, синовиальной жидкости.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные. Обеспечивает возможность проведения до 8 независимых процедур выделения по 6 образцов в каждой, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на выделении нуклеиновых кислот из пробы совместно с предварительно внесённым **внутренним контрольным образцом (ВКО)** и проведении реакции амплификации выбранного фрагмента ДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект реагентов для выделения предназначен для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов: сыворотки *(плазмы)* крови, биоптатов, ликвора, мочи, бронхоальвеолярного лаважа, мокроты, синовиальной жидкости. Для предобработки образцов, содержащих комки слизи *(мокрота, синовиальная жидкость)* в набор включен раствор для обработки мокроты.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каж-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

дом цикле ПЦР. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым ВКО.

2.2. Состав набора:

раствор для обработки мокроты – 4 фл. по 50 мл.

Комплект реагентов для выделения ДНК:

- лизирующий раствор – 8 фл. по 4 мл;
- осадитель НК – 4 фл. по 12 мл;
- раствор для отмывки №1 – 4 фл. по 8 мл;
- раствор для отмывки №2 – 4 фл. по 5 мл;
- элюирующий раствор – 4 фл. по 3 мл;
- сорбент *(суспензия магнитных частиц)* – 1 фл., 1 мл.
- раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 фл., 4 мл;
- отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 фл. по 1 мл;
- внутренний контрольный образец (ВКО), лиофилизированный – 2 фл.

Комплект реагентов для проведения ПЦР

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок.

Принадлежности:

- завинчивающиеся пластиковые крышки для флаконов с ВКО – 2 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ*

3.1. **Чувствительность** выявления ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия, СОП МВТС *(СОП 05-2-430)*, с содержанием ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса 100 копий в пробе – 100%.

3.2. **Специфичность** выявления ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса определяется определяется по пяти образцам отрицательных биопроб, приготовленным из стандартного образца предприятия, СОП МВТС *(СОП 05-2-430)* 100%.

3.3. **Диагностическая чувствительность** выявления ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса: клинические испытания, проведённые на 119 положительных образцах, показали 100% чувствительность *(интервал 97,5%–100%, с доверительной вероятностью 90%);*

3.4. **Диагностическая специфичность** выявления ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса: клинические испытания, проведённые на 119 отрицательных образцах, показали 100% специфичность *(интервал 97,5%–100%, с доверительной вероятностью 90%).*

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б *(Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н)*.

4.2. Компоненты набора *(РВК и ОКО)* содержат в своем составе натрия азид *(0,05% раствор)*. При работе с набором следует избегать попадания его компонентов на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности *(опасности)* и возбудителями паразитарных болезней».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР/ОТ-ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором следует надевать **одноразовые** медицинские перчатки.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать **только одноразовые** наконечники с фильтром для дозаторов.

4.8. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.9. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1–3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Мистраль»; 0,5–2% раствор «Велтолен»).*

4.10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией *(см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).*

4.11. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются *(утилизируются)* в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» *(фирма «Corbett Research», Австралия)*, «Rotor-Gene Q» *(фирма «Qiagen», Германия)* или планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналог;
- ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты *(бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы»)*;
- термошейкер – термостатируемый встряхиватель орбитального типа, позволяющий проводить встряхивание при 1300 об/мин и температуре (50–65) °С *(например, «Thermo Shaker TS-100» [с блоком для пробирок объёмом 2 мл], фирма «BioSan», Латвия)*;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» *(фирма «Eppendorf», Германия)*;
- дозаторы механические одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками *(например, фирма «Biohit», Финляндия)*;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые *(перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare, Германия);*
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером *(например, фирма «FinnTip», Финляндия)*;
- одноразовые наконечники для дозаторов *(например, фирма «FinnTip», Финляндия);*
- одноразовые полипропиленовые пробирки на 2 мл *(например, фирма «SSI», США)*;
- магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот *(АО «Вектор-Бест);*
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл *(например, фирма «Хеликон», Россия);*
- отсасыватель медицинский *(например, В-40, «ВИСМА-ПЛАНАР», республика Беларусь)*;
- контейнер для сброса отходов *(например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный).*

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

6.1.1. Подготовка образцов плазмы крови.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Для проведения анализа используются образцы плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта ЭДТА.

Внимание! *Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной плазмы.*

В течение 6 часов после взятия крови следует отобрать плазму в отдельную пробирку.

Транспортировать и хранить образцы:
– при температуре (18–25) °С до 2 часов;
– при температуре (2–8) °С не более суток;
– при температуре минус (18–24) °С до 2 недель.

Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

Образцы плазмы крови перед использованием необходимо центрифугировать при 13000 об/мин при температуре (18–25) °С в течение 5 минут.

6.1.2. Подготовка ликвора.

Образцы ликвора готов к анализу.

Транспортировать и хранить образцы:
– при температуре (18–25) °С до 2 часов;
– при температуре (2–8) °С не более суток;
– при температуре минус (18–24) °С до 2 недель.

Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

6.1.3. Подготовка образцов биоптатов.

Подготовку образцов биоптатов проводить согласно процедуре, описанной в Методических указаниях «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» *(МУ 1.3.2569-09).*

6.1.4. Подготовка образцов мочи.

Первую порцию утренней мочи собрать в чистый флакон с плотной крышкой. 1,5–2,0 мл мочи отобрать в пробирку, центрифугировать при 3000 об/мин в течение 3 минут. Супернатант удалить практически полностью, не задевая осадок. Полученный образец использовать для выделения нуклеиновых кислот.

Допускается хранение подготовленных образцов из мочи в замороженном состоянии при температуре минус (18–24) °С в течение 1 недели.

6.1.5. Подготовка бронхоальвеолярного лаважа или промывных вод бронхов.

Содержимое контейнера перемешать переворачиванием, 1,5–2 мл образца перенести в пробирку, центрифугировать при 13000 об/мин 5 минут. Супернатант удалить, не задевая осадок, оставляя 200 мкл образца. Осадок ресуспендировать, отобрать для анализа 100 мкл образца, не захватывая комки слизи. При большом объёме слизи, обработать пробу согласно пункту 6.1.6.

Транспортировать и хранить образцы:
– при температуре (18–25) °С до 2 часов;
– при температуре (2–8) °С не более суток;
– при температуре минус (18–24) °С до 2 недель.

Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

6.1.6. Подготовка мокроты, синовиальной жидкости.

К образцу мокроты *(синовиальной жидкости)* добавить равный объём **Раствора для обработки мокроты**. Тщательно перемешать, выдержать при комнатной температуре 10 минут. Ещё раз тщательно перемешать. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения нуклеиновых кислот. Не захватывать комки слизи.

Транспортировать и хранить образцы:
– при температуре (18–25) °С до 2 часов;
– при температуре (2–8) °С не более суток;
– при температуре минус (18–24) °С до 2 недель.

Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать 1 ПКО и 1 ОКО.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать анализируемые образцы и компоненты набора при температуре (18–25) °С в течение 30 минут.

6.2.2. Во флакон с ВКО добавить **1 мл раствора РВК,** аккуратно перемешать, выдержать при температуре (18–25) °С 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18–24) °С не более 3 месяцев.

6.2.3. **ОКО** готов к применению.

После вскрытия флакона хранить при температуре (2–8) °С не более 3 месяцев.

6.2.4. Перед началом работы прогреть лизирующий раствор при (50–60) °С до растворения осадка, перемешать. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной суспензии и во флакон с лизирующим раствором добавить **80 мкл суспензии сорбента**. Тщательно перемешать.

Лизирующий раствор после вскрытия и добавления суспензии сорбента хранению не подлежит.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объёмом 2 мл *(по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контрольные образцы)*.

7.2. В каждую пробирку внести по **30 мкл** раствора **ВКО**.

7.3. Для отрицательного контроля в пробирку, маркированную «ОКО», внести **100 мкл ОКО**.

7.4. Для положительного контроля в пробирку, маркированную «ПКО», внести **70 мкл ОКО** и **30 мкл ПКО**.

ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18–24) °С не более 3 месяцев.

7.5. В остальные пробирки дозатором с отдельными наконечниками внести по **100 мкл анализируемых образцов** в соответствии с маркировкой пробирок.

7.6. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по **300 мл лизирующего раствора с сорбентом**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Выдержать в термошейкере с частотой вращения 1300 об/мин при 65 °С в течение 10 минут. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

7.7. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по **400 мкл осадителя НК**.

7.8. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Центрифугировать при 13000 об/мин при температуре (18–25) °С в течение 5 минут.

7.9. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки дозатором *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.10. В каждую пробирку к осадку добавить **500 мкл раствора для отмывки № 1**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 2 минут.

7.11. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость дозатором *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.12. В каждую пробирку к осадку добавить по **300 мкл раствора для отмывки № 2**. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 секунд. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 2 минут.

7.13. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость дозатором *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.14. Высушить осадки в открытых пробирках при температуре (18–25) °С в течение 2–3 минут.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.15. В каждую пробирку к осадку добавить **200 мкл элюирующего раствора**. Тщательно перемешать на вортексе, ресуспендируя магнитный осадок. Инкубировать в термошейкере с частотой вращения 1300 об/мин при 65 °С в течение 5 минут. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 1 минуты. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Внимание! *Выделенная ДНК хранится при температуре (2–8) °С не более 24 часов.*

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

8.2. Вскрыть упаковку с ГРС и отобрать необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО)* пробирок с ГРС. Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в пакет из комбинированного материала с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2–8) °С составляет 3 месяца.

8.3. Пробирки с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! *При использовании амплификатора «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» надписи следует располагать на крышке пробирок.*

При использовании амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» надписи следует располагать на боковой части пробирок.

8.4. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести по **50 мкл** соответствующего **раствора выделенной ДНК** *(из пробирок, установленных в магнитный штатив)*. Не захватывать осадок! Плотно закрыть пробирки крышками.

8.5. Поместить пробирки в амплификатор.

8.6. Запрограммировать протокол для проведения амплификации специфического фрагмента **ДНК** и **ВКО:**

для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;
2 стадия: 95 °С – 2 минуты;
3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд)*.

для приборов «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;
2 стадия: 95 °С – 2 минуты;
3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 40 секунд)*;

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °С.

8.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации **ДНК ВКО** и **ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса**:

– **«FAM»** *(для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»)*, **«Green»** *(для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»)* – для регистрации сигнала **ДНК ВКО**;

– **«ROX»** *(для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»)*, **«Orange»** *(для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»)* – для регистрации сигнала **ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса**.

8.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

8.8. Запустить программу и провести ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

9. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Условия анализа и учёта результатов.

9.1.1. В **ПКО** программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** в канале **«FAM»**/**«Green»** и определять значение

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

порогового цикла **Ct ВКО**.

– нарастание сигнала амплификации **ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса** в канале **«ROX»/«Orange»** и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**;

9.1.2. В **ОКО** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** в канале **«FAM»/«Green»** и определять **Ct ВКО**, при этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала амплификации ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса в канале **«ROX»/«Orange»**.

9.1.3. В **каждом исследуемом образце** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО *(канал «FAM»/«Green»)* и определять **Ct** ВКО.

9.2. Учёт результатов.

9.2.1. Вычислить $(\textbf{Ct}\ ВКО)_{ср}$ как среднее значение **Ct** ВКО всех анализируемых образцов *(включая ПКО и ОКО)*. Отбраковке подлежат значения **Ct** ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(\textbf{Ct}\ ВКО)_{ср}$. После отбраковки пересчитать $(\textbf{Ct}\ ВКО)_{ср}$ для оставшихся значений.

9.2.2. Анализируемый образец считается **положительным** *(содержащим ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса)* если для этого образца значение **Ct** по каналу **«ROX»/«Orange» меньше или равно 40**.

9.2.3. Результат анализа образца считается **отрицательным** *(не содержащим ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса)*, если для этого образца значение **Ct** в канале **«ROX»/«Orange» больше 40 или не определяется**.

Если для такого образца значение **Ct** ВКО отличается от значения $(\textbf{Ct}\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то результат исследования данного образца не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

9.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики *(потребительские свойства)* которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

*По вопросам, касающимся качества набора **«РеалБест ДНК МВТС»**, следует обращаться в **АО***

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383): 252-51-62, 227-60-30;

тел./факс (383): 252-51-81, 252-51-77;

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Проведение анализа на приборе «ДТ-96»

(НПО «ДНК-Технология»)

1. Настройка экспозиции измерений.

В режиме **«Работа с прибором»** в меню **«Настройки»** выберите пункт **«Экспозиция измерений»**.

В открывшемся окне выберите канал **«FAM»**, измените значение экспозиции на «**250**», для каналов **«HEX»** и **«ROX»** установите значение экспозиции «**1000**». Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав «**ДА**».

Внимание! *Указанные значения экспозиций применимы только для наборов «РеалБест» и при необходимости должны быть изменены на исходные.*

2. Программирование амплификатора.

2.1. Для создания протокола амплификации нажать кнопку **«Создать»** во вкладке **«Запуск программы амплификации»**.

2.2. В открывшемся окне выбрать первый шаблон программы амплификации, отредактировать его в соответствии с программой амплификации к используемому набору:

Для наборов **«РеалБест ДНК»:**

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);*

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

Для наборов **«РеалБест РНК»:**

1 стадия: 45 °С – 30 минут;

2 стадия: 94 °С – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);*

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

2.3. В ячейке **«Имя программы»** ввести название созданного протокола амплификации *(например, PCR и RT-PCR)* и нажать **«ОК»**. В открывшемся окне указать папку для сохранения файла и нажать **«сохранить»**.

2.4. В ячейке **«Объём рабочей смеси»** указать значение «**50**».

2.5. Во вкладке **«Протокол»** сначала ввести названия всех образцов, участвующих в постановке, затем заполнить планшет.

Для упрощения заполнения планшета можно создать заготовку, для этого в меню **«Тест»** выбрать **«Создать/редактировать тест»**, затем **«Копировать текущий тест»** с именем TEST и присвоить имя новому тесту.

В открывшемся окне в пункте **«1.Анализ»** выставить тип анализа *(количественный или качественный со стандартами в соответствии с набором)* и метод **«Геометрический (Ср)»**.

Для качественного анализа в пункте **«4.Контроли»** выставить «**1**»; для количественного анализа со стандартами *(при постановке с КО1, КО2)* в пункте **«3.Стандарты»** в ячейке **«Количество»** выставить «**2**», в ячейке **«2.Дубли»** – «**3**», в пункте **«4.Контроли»** в ячейке **«$К^+$»** выставить «**3**», в ячейке **«$К^-$»** – «**1**».

Если постановка без КО1 и КО2, то в пункте **«3.Стандарты»** в ячейке **«Количество»** поставить «**0**».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В пункте **«5.Объём рабочей смеси в пробирке»** выставить значение «**50**».

В пункте **«6. Флуорофоры»** обозначить **внутренний контроль (ВК)** по каналу **«FAM»** и специфику по каналу **«HEX»** или **«ROX»** в соответствии с инструкцией к набору.

По завершении редактирования нажать **«ОК»**.

В дальнейшем при заполнении протокола следует использовать кнопку **«Добавить тест»**, из списка выбрать нужный для данной постановки и ввести число образцов и контролей.

По окончании заполнения протокола нажать **«Применить»**.

2.6. Программа перейдет на вкладку **«Запуск программы амплификации»**, запустить амплификацию кнопкой **«Запуск программы»**. Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «**Запуск программы**» в файл с расширением *.r96.

3. Анализ и учёт результатов.

Детекция флуоресценции осуществляется по каналам «**FAM**» и «**ROX**» для ДНК ВКО и ДНК возбудителя, соответственно.

Программа автоматически высчитывает пороговое значение флуоресценции по методу **Геометрический (Ср)**.

При одновременном выявлении ДНК двух возбудителей ДНК второго возбудителя детектируется по каналу «HEX».

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Программирование прибора и анализ результатов при использовании амплификаторов роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000»

(фирма «Corbett Research», Австралия), **«Rotor-Gene Q»** *(фирма «Qiagen», Германия)*

Далее по тексту каналы детекции и термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения, указаны в следующем порядке: «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q»).

Программирование прибора:

1) Нажать кнопку **«New»** (*«Новый»*) в основном меню программы.

2) В открывшемся окне выбрать шаблон запуска эксперимента **«Advanced»** *(«Детальный мастер»)* и нажать кнопку **«New»** (*«Новый»*).

3) Выбрать ротор на 36 лунок **«36-Well Rotor»** *(«36-луночный ротор»)*, и отметить, что используются пробирки с плоскими крышками *(отметить, что кольцо закреплено)*. Нажать кнопку **«Next»** *(«Далее»)*.

4) В открывшемся окне выбрать объём реакционной смеси **50 мкл**. Нажать кнопку **«Next»** *(«Далее»)*.

5) В открывшемся окне необходимо задать температурный профиль эксперимента. Для этого нажать кнопку **«Edit Profile»** *(«Редактор профиля»)* и задать следующие параметры:

1	Hold 1 *(Удержание температуры 1)*	50 °C	2 минуты
2	Hold 2 *(Удержание температуры 2)*	95 °C	2 минуты
3	Cycling *(Циклирование)*	94 °C 60 °C*	10 секунд 40 секунд
Cycle repeats *(цикл повторить)*		50 times *(раз)*	

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C по каналам **«FAM» и **«ROX»** («Green» и «Orange»).*

6) После того как выбран температурный профиль эксперимента, нажать кнопку **«ОК»**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7) В окне **«New Run Wizard»** *(«Мастер нового теста»)* нажать кнопку **«Calibrate»** *(«Опт. Уровень сигнала»)*. В открывшемся окне в строке **«Channel Settings»** *(«Установки канала»)* выбрать канал **«ROX»** *(«Orange»)*, нажать **«Add»** *(«Добавить»)*. Установить **«Tube Position»** *(«Позиция пробирки»)* **1**, **«Min Reading» 5**, **«Max Reading» 10** *(«Нужный диапазон стартового сигнала» 5FL до 10FL)*, нажать **«ОК»**. В строке **«Channel Settings»** *(«Установки канала»)* выбрать канал **«FAM»** *(«Green»)*, нажать **«Add»** *(«Добавить»)*. Установить «**Tube Position»** *(«Позиция пробирки»)* **1**, **«Min Reading» 5**, **«Max Reading» 10** *(«Нужный диапазон стартового сигнала» 5FL до 10 FL)*. Нажать **«ОК»**.

Отметить галочкой «**Perform Calibration Before 1st Acquisition»** *(«Выполнить оптимизацию при первом шаге детекции»)*. Нажать кнопку **«Close»** *(«Закрыть»)*.

8) Нажать кнопку **«Next»** *(«Далее»)*, запустить амплификацию кнопкой **«Start run»** *(«Старт»)*.

9) Сохранить файл в папке Rotor-Gene/templates под названием РеалБест с расширением*.ret. Тогда при дальнейшей работе программа РеалБест будет представлена в списке **«New»** *(«Новый»)* в основном меню программы. Заново создавать температурный протокол или протокол калибровки не потребуется.

10) Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки **«Start run»** *(«Старт»)* в файл с расширением *.rex.

Анализ результатов амплификации ДНК ВКО:

1) Нажать в меню кнопку **«Analysis»** *(«Анализ»)*, выбрать режим анализа **«Quantitation»** *(«Количественный»)*, нажать кнопку **«Cycling A. FAM»** *(«Cycling A. Green»)*, **«Show»** *(«Показать»)*.

2) Отменить автоматический выбор **Threshold** *(порога)*, нажав кнопку **«ОК»** в появившемся окне.

3) Нажать клавишу **«Linear scale»** *(«Линейная шкала»)*. Надпись должна измениться на **«Log. Scale»** *(«Лог. шкала»)*.

4) В меню основного окна **«Quantitation analysis»** *(«Количественный анализ»)* должны быть нажаты две кнопки **«Dynamic tube»** *(«Динамический фон»)* и **«Slope Correct»** *(«Корректировка уклона»)*.

5) В меню **«Quant. Settings»** *(«More Settings»)* *(«Устранение выбросов»)* установить значение **NTC threshold** *(«Процент от наибольшего изменения флуоресценции»)* **5%**.

6) В меню **«CT Calculation»** *(«Вычисление CT»)* *(в правой части окна)* **выставить Threshold** *(порог)* **= 0,04.**

7) В таблице результатов – ***окно «Quant. Results»*** *(«Количественные результаты»)* появятся значения **Ct**.

Анализ результатов амплификации ДНК микобактерий туберкулеза:

1) Нажать в меню кнопку **«Analysis»** *(«Анализ»)*, выбрать режим анализа **«Quantitation»** *(«Количественный»)*, нажать кнопку **«Cycling A. ROX»** *(«Cycling A. Orange»)*, **«Show»** *(«Показать»)*.

2) Отменить автоматический выбор **Threshold** *(порога)*, нажав кнопку **«ОК»** в появившемся окне.

3) Нажать клавишу **«Linear scale»** *(«Линейная шкала»)*. Надпись должна измениться на **«Log. Scale»** *(«Лог. шкала»)*.

4) В меню основного окна «**Quantitation analysis»** *(«Количественный анализ»)* должны быть нажаты две кнопки **«Dynamic tube»** *(«Динамический фон»)* и **«Slope Correct»** *(«Корректировка уклона»)*.

5) В меню **«Quant. Settings»** *(«More Settings»)* *(«Устранение выбросов»)* установить значение **NTC threshold** *(«Процент от наибольшего изменения флуоресценции»)* **5%.**

6) В меню **«CT Calculation»** *(«Вычисление CT»)* *(в правой части окна)* выставить **Threshold** *(порог)* **= 0,04**.

7) В таблице результатов – окно **«Quant. Results»** *(«Количественные результаты»)* появятся начения **Ct**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ n	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов	NON STERILE	Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru