**«УТВЕРЖДАЮ»**
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«__» _____ 2022 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Toxoplasma gondii*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
**(РеалБест ДНК Toxoplasma gondii**
**(комплект 1))**

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«РеалБест ДНК Toxoplasma gondii»** предназначен для выявления ДНК *Toxoplasma gondii* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов: **«РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 3»** и **«РеалБест экстракция 100».**

**Комплект 1** предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналогами.

**Комплект 1** рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР.

Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичных для данных участков ДНК *Toxoplasma gondii* гибридизационных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'- конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'–3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции.

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

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в образце ПКО, который подвергается процедуре выделения ДНК вместе с анализируемыми биопробами.

Учет эффективности выделения ДНК *Toxoplasma gondii* из образцов обеспечивается выделением ДНК из клинических проб совместно с предварительно внесенным **внутренним контрольным образцом (ВКО).**

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

**2.2. Состав набора:**

- положительный контрольный образец (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагментов ДНК *Toxoplasma gondii* – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок.

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1 лист.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. **Чувствительность** – определение 100 копий ДНК *Toxoplasma gondii* в пяти образцах, приготовленных из стандартного образца предприятия (СОП) ДНК *Toxoplasma gondii* – 100 %.

3.2. **Специфичность** определения ДНК *Toxoplasma gondii (по стандартной панели отрицательных сывороток предприятия, СПП ОКС)* – 100 %.

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б *(ГОСТ Р 51609-2000).*

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

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

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

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

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

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

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов 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»).*

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» *(фирма «Bio-Rad», США)*, «ДТ-96» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)* или их аналог;
- ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом *(фирма «Ламинарные системы», Россия);*
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» *(фирма «Eppendorf», Германия);*
- пипетки полуавтоматические *(дозаторы механические)* одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками *(фирма «Biohit», Финляндия)*;
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые *(перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия)*;
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером *(фирма «Biohit», Финляндия);*
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл *(фирма «Хеликон», Россия)*;

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

- магнитный штатив для пробирок на 2 мл *(АО «Вектор-Бест», Россия; или аналогичный)*;
- одноразовые полипропиленовые пробирки вместимостью 2 мл *(фирма «SSI», США, кат. № 2340; или аналогичные)*;
- контейнер для сброса отходов *(например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный)*;
- нож канцелярский.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: **«РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100»** согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и **отрицательный контрольный образец (ОКО)**, который является компонентом набора для выделения ДНК.

*Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать при температуре (18–25) °С не менее 30 минут.*

*Выделенную ДНК хранить при температуре (2–8) °С не более 2 суток.*

*ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца.*

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке *(не вскрывая!)* при температуре (18–25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО)* пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

***Внимание!*** *Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.*

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

7.2. Необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контроли)* пробирок с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

***Внимание!*** *Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Крышки или оптическая плёнка должны оставаться чистыми!*

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по **50 мкл** соответствующего **раствора выделенной ДНК.** Плотно закрыть пробирки крышками или заклеить оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов **ДНК *Toxoplasma gondii*, ДНК ВКО** и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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.*

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации **ДНК *Toxoplasma gondii*** и **ДНК ВКО**:

Для регистрации процесса амплификации **ДНК ВКО** следует выбрать канал детекции **«FAM».**

Для регистрации процесса амплификации **ДНК *Toxoplasma gondii*** следует выбрать канал детекции **«ROX».**

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

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

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой **«РеалБест диагностика»** программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов учет результатов проводить в соответствии с **разделом 9** данной инструкции и **Приложением**.

## 9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

нарастание сигнала амплификации **ДНК *Toxoplasma gondii*** *(канал «ROX»)* и определять значение порогового цикла **Ct** ПКО;

нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** *(канал «FAM»)* и определять значение порогового цикла **Ct** ВКО.

9.2. В **ОКО** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** *(канал «FAM»)* и определять **Ct** ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу **«ROX»**.

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

9.4. Вычислить (**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 (**Ct** ВКО)$_{ср}$. После отбраковки пересчитать (**Ct** ВКО)$_{ср}$ для оставшихся значений.

9.5. Анализируемый образец **считается положительным**, содержащим ДНК *Toxoplasma gondii*, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 40.**

9.6. Результат анализа образца **считается отрицательным,** если для этого образца зна-чение **Ct** по каналу **«ROX» больше 40 или не определяется.**

Если для такого образца значение **Ct** ВКО превышает значение (**Ct** ВКО)$_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.7. Если для ОКО значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 40**, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в 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, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

## 10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

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

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

## 11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

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

*По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в* ***АО «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:

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- 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 следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;
- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;
- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;
- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации;
- Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности;
- Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.
- 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.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### 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.*

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

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**».

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».**

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

## ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

| | | | |
|---|---|---|---|
|  | Номер по каталогу |  | Медицинское изделие для диагностики *in vitro* |
|  | Содержимого достаточно для проведения n количества тестов |  | Не стерильно |
|  | Код партии |  | Температурный диапазон |
|  | Дата изготовления: XXXX-XX-XX<br>Формат даты: год-месяц-число |  | Изготовитель |
|  | Использовать до: XXXX-XX-XX<br>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