ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ

Инструкция по применению
БакСкрин УПМ

Организация-производитель

СОГЛАСОВАНО

Генеральный директор

ООО «ДНК-Технология ТС»

_____ С.А. Самарин

«01» июля 2022 г.

Организация-разработчик

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПФ ДНК-Технология»

_____ С.П. Левичев

«_____» _____ 2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выявления ДНК условно-патогенных бактерий классов Bacilli, Betaproteobacteria и Gammaproteobacteria, вызывающих нозокомиальные и внебольничные инфекции, методом ПЦР в режиме реального времени

(БакСкрин УПМ)

2022 г.

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

ВК	- внутренний контроль
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ИВ	- интерферирующие вещества
К-	- отрицательный контрольный образец
К+	- положительный контрольный образец
ЛКО	- лабораторный контрольный образец
ОБМ	- общая бактериальная масса
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
УПМ	- условно-патогенные микроорганизмы

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

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционные болезни и в современном мире остаются одной из ведущих проблем медицины, в значительной степени определяя и здоровье людей, и продолжительность жизни. Патогенность возбудителей инфекционных болезней – отличительный признак, позволяющий подразделять микроорганизмы на группы. К условно-патогенным микроорганизмам (УПМ) относятся возбудители, вызывающие развитие инфекционного процесса только при определенных условиях, снижении иммунитета.

Часть этих бактерий представлена свободноживущими микроорганизмами. Они иногда попадают на эпителиальные поверхности или во внутреннюю среду человека и могут вызывать инфекционные заболевания (например, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*).

Другая группа адаптирована к существованию в нестерильных частях организма человека, связанных с окружающей средой (кожный покров, желудочно-кишечный тракт, верхние отделы дыхательных путей). Ее представители составляют нормальную (эндогенную) микрофлору человека, но различаются по вирулентности.

Одни из них, практически никогда не вызывают заболеваний человека, другие - часто, например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* [1].

Различные виды бактерий проявляют тропность к определенным анатомическим нишам. В связи с этим каждому биотопу организма свойственна своя относительно постоянная флора. Являясь одним из защитных механизмов организма, она также может быть и резервуаром возбудителей экзо- и эндогенных инфекций. В каждом биоценозе регистрируются как резидентные, так и транзиторные микроорганизмы, среди которых немаловажное значение имеют условно-патогенные представители. Отдельные виды УПМ участвуют в формировании нормальной микрофлоры макроорганизма и в патогенезе ряда заболеваний [3].

Представители УПМ могут вызывать инфекционные процессы при самых разнообразных внешних и внутренних изменениях и условиях:

- прием различных медикаментов (иммунодепрессанты, гормоны, антибактериальные препараты и т.д.);
- воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды;
- снижение иммунитета;
- стационарное лечение;
- беременность и роды;
- преклонный и детский возраст;

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

- травматические состояния (механические повреждения целостности кожи, ожоги и др.);
- хронические заболевания (диабет, онкология и т.д.) [5].

Особый интерес представляют заболевания, которые вызываются условно-патогенными микроорганизмами в стационарах – нозокомиальные (госпитальные) инфекции. Проблема возникновения и лечения таких инфекций в настоящее время стоит перед здравоохранением как в нашей стране, так и за рубежом [3]. Часто нозокомиальные заболевания характеризуются тяжелым течением с увеличением сроков пребывания в стационаре.

Инфекционные заболевания, например, поражения верхних и нижних дыхательных и мочевыводящих путей, кожи и мягких тканей и т.д., возникшие не в медицинском учреждении (внебольничные), также часто вызываются УПМ.

В тенденции последних десятилетий входит приобретение УПМ новых свойств, которые приводят к повышению тяжести течения заболеваний. К ним в первую очередь относится приобретение множественной резистентности к антибактериальным препаратам и других патогенных особенностей (адгезивные свойства и способность к пленкообразованию, факторы персистенции) [2].

Существуют традиционные фенотипические и молекулярно-генетические методы идентификации микроорганизмов. Фенотипические методы, определяющие способность микроорганизмов использовать в качестве субстрата различные питательные среды, достаточно длительны и трудоемки для проведения.

Для многих инфекций, вызываемых вирусами и бактериями, разработаны молекулярно-биологические методы диагностики, например, полимеразная цепная реакция (ПЦР) [1].

Молекулярно-генетическое исследование позволяет выявлять ДНК микроорганизмов, идентифицируя их до заданного таксономического порядка. Преимуществом его является высокая чувствительность, скорость получения результатов, стандартизованность и технологичность исследования. Важно, что не требуются манипуляции с живыми бактериальными культурами, что служит предотвращению распространения и циркуляции микроорганизмов внутри лечебно-диагностических и лабораторных учреждений.

Решение об этиологической значимости УПМ должно определяться не видовой или родовой принадлежностью обнаруженных микроорганизмов, а на основе комплексного

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

исследования в динамике и при сопоставлении с клиническими и эпидемиологическими данными [4].

При помощи набора реагентов выявляется ДНК 25 бактериальных представителей, часто вызывающих развитие нозокомиальных и внебольничных заболеваний. Все перечисленные микроорганизмы относятся к 3 классам: *Bacilli*, *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*.

Список литературы

1. Инфекционные болезни: учебник для студентов медицинских вузов / Е.П. Шувалова, Е.С. Белозеров, Т.В. Беляева, Е.И. Змушко [и др.]. – 7-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. – 1835 с.
2. Катрецкая, Г.Г. Факторы вирулентности условно-патогенной микрофлоры нижних дыхательных путей при пневмониях // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2012. – №43. – С. 61-64.
3. Покателов, А.А. Бактериальная колонизация и сукцессия у больных хирургических стационаров с различной экологической нагрузкой в условиях крупного промышленного города / А.А. Покателов // Автореф. дис. к-та мед. наук. – Волгоград, 2009. – 142 с.
4. Покровский, В.И. Пути совершенствования лабораторной диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, Н.И. Брико и др. // Медицинский альманах. – 2012. – № 2. – С. 12-16.
5. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / [Аковбян В.А. и др.]; под ред.: Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – М.: Боргес, 2002. – 379 с.

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

1 ПРЕДНАЗНАЧЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

6.1 **Полное наименование:** Набор реагентов для выявления ДНК условно-патогенных бактерий классов Bacilli, Betaproteobacteria и Gammaproteobacteria, вызывающих нозокомиальные и внебольничные инфекции, методом ПЦР в режиме реального времени (БакСкрин УПМ), далее по тексту – набор реагентов.

6.2 **Назначение:** набор реагентов предназначен для выявления ДНК условно-патогенных бактерий классов *Bacilli*, *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*, вызывающих нозокомиальные и внебольничные инфекции, в препаратах ДНК, полученных из биологического материала человека и бактериальных культур из этого биоматериала (мокрота, моча, мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии, аспираты, экссудаты) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Набор реагентов выявляет ДНК следующих бактерий:

Класс *Bacilli*: *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae, Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*;

Класс *Betaproteobacteria*: *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia* spp.;

Класс *Gammaproteobacteria*: *Acinetobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri, Enterobacteriales, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Haemophilus spp., Haemophilus influenzae, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii, Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

6.3 **Функциональное назначение:** диагностика *in vitro*.

6.4 **Показания к проведению анализа:** симптомы инфекционного процесса. Противопоказаний к применению нет.

6.5 **Демографические и популяционные аспекты:** применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

6.6 **Область применения:** набор реагентов может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

6.7 **Потенциальные пользователи:** квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

6.8 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

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

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

6.1 Состав набора реагентов

REF R1-P028-S3/6, фасовка S			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смеси для амплификации, запечатанные парафином. Стрип №1	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость под белым воскообразным слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Смеси для амплификации, запечатанные парафином. Стрип №2	Прозрачная бесцветная или голубая жидкость под белым воскообразным слоем	12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	320 мкл
Крышки для стрипов	24 шт.		

Все компоненты набора реагентов готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки к работе.

6.2 Количество анализируемых образцов

Набор реагентов предназначен для одноразового применения и рассчитан на проведение 12 определений, что соответствует исследованию не более 8 неизвестных образцов, отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца.

6.3 Принцип метода

Метод: Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный мультиплексный анализ.

Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в реакционную смесь происходит только после плавления

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

парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки. Помимо этого, после окончания реакции и остывания пробирок, парафин обеспечивает запечатывание реакционной смеси и дополнительную защиту от контаминации ампликонами.

Набор реагентов включает смеси для амплификации, специфичные для выявления ДНК условно-патогенных бактерий и для определения вспомогательных аналитов: ДНК всех бактерий (Общая бактериальная масса), ДНК человека (КВМ – контроль взятия материала), а также содержит внутренний контроль (ВК), являющийся индикатором качества реакции в каждой отдельной пробирке (кроме пробирки №16, см. таблицу 1).

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется детектирующим амплификатором.

Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов. Уровень флуоресценции измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени.

В состав смеси для амплификации включен внутренний контроль (ВК), который предназначен для оценки качества прохождения полимеразной цепной реакции. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации участков бактериальной ДНК, включены флуоресцентные метки Fam и Cy5, ОБМ – Fam, КВМ – Cy5. В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продукта амплификации внутреннего контроля, входит флуоресцентный краситель Hex.

В смесь для амплификации пробирок № 1 и № 10 добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором для определения положения стрипа в термоблоке детектирующего амплификатора. После окончания программы амплификации прибор проводит сравнение заданного оператором расположения стрипов с реальным положением маркера Rox, и, если находит несовпадение (при неправильном расположении стрипов), то предупреждает об этом оператора.

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

В таблице 1 приведены каналы детекции продуктов амплификации.

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

Таблица 1 – Выявляемые показатели, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

тип стрипа	№ пробирки	Fam	Hex	Rox	Cy5	Цветовая маркировка смеси
«Стрип №1»	1	ОБМ	ВК	Маркер	-	Голубая
	2	*Streptococcus pyogenes*	ВК	-	-	Бесцветная
	3	*Citrobacter freundii*	ВК	-	*Citrobacter koseri*	
	4	*Burkholderia* spp.	ВК	-	-	
	5	*Streptococcus pneumoniae*	ВК	-	*Streptococcus* spp.	
	6	*Staphylococcus aureus*	ВК	-	*Staphylococcus* spp.	
	7	*Klebsiella pneumoniae/ Klebsiella oxytoca*	ВК	-	*Klebsiella pneumoniae*	
	8	*Acinetobacter* spp.	ВК	-	-	
«Стрип №2»	9	*Enterobacter cloacae*	ВК	-	*Serratia marcescens*	
	10	*Stenotrophomonas maltophilia*	ВК	Маркер	*Haemophilus* spp.	Голубая
	11	*Haemophilus influenzae*	ВК	-	-	Бесцветная
	12	*Morganella morganii*	ВК	-	*Enterobacteriales*	
	13	*Enterococcus* spp.	ВК	-	КВМ	
	14	*Escherichia coli*	ВК	-	*Pseudomonas aeruginosa*	
	15	*Streptococcus agalactiae*	ВК	-	*Proteus* spp.	
	16	*Achromobacter ruhlandii*	-	-	*Achromobacter xylosoxidans*	

Исследование состоит из следующих этапов: выделение ДНК (пробоподготовка) и ПЦР-амплификация с использованием набора реагентов БакСкрин УПМ.

6.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки): от 1,5 часов.

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

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

6.1 Специфичность анализа

В образцах материала, содержащего ДНК выявляемых бактерий, во время проведения амплификации детектирующий амплификатор фиксирует положительные результаты амплификации специфических продуктов в соответствующих пробирках по заявленным каналам детекции.

В образцах материала, не содержащего ДНК выявляемых бактерий, при проведении амплификации детектирующий амплификатор фиксирует отрицательные результаты амплификации специфических продуктов в соответствующих пробирках по заявленным каналам детекции.

При исследовании аналитической специфичности выявлены специфические результаты амплификации при наличии в образце ДНК выявляемых аналитов: *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia* spp.; *Acinetobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Entrobacteriales*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus* spp., P*seudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*; *Achromobacter ruhlandii*, *Staphylococcus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. Показано отсутствие перекрестных неспецифических реакций каждой из систем, входящей в состав набора реагентов по отношению к возбудителям, определяемым другими системами.

Показано отсутствие неспецифических положительных результатов амплификации при наличии в образце нуклеиновых кислот следующих микроорганизмов: *Campylobacter spp.*, *Candida* spp., *Chlamydophila pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Salmonella* spp. в концентрации не менее $2x10^3$ копий на амплификационную пробирку), а также ДНК человека в концентрации более 750 нг на амплификационную пробирку.

6.2 Интерферирующие вещества

Наличие ингибиторов ПЦР в образце биологического материала может быть причиной сомнительных (неопределённых) результатов. Признаком полного ингибирования ПЦР является одновременное отсутствие амплификации внутреннего контроля и специфического продукта (см. 2.3, 9.3).

К ингибиторам ПЦР, которые могут присутствовать в образце ДНК, отнесены следующие эндогенные и экзогенные интерферирующие вещества: гемоглобин, билирубин, холестерин, слизь (муцин) и лекарственные препараты (пиносол, хлоргексидина биглюконат,

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

индометацин суппозитории, ринофлуимуцил, октенисепт), находящиеся в образце, а также изопропиловый спирт и метилацетат, остающиеся в образце ДНК в результате неполного удаления промывочных растворов в ходе пробоподготовки.

Максимальные концентрации интерферирующих веществ, при которых не наблюдалось ингибирование ПЦР, представлены в таблице ниже.

Вид биоматериала	Интерферирующее вещество	Концентрация ИВ
Эндогенные вещества		
Фекалии, моча, мазки\соскобы из желудочно-кишечного тракта	Билирубин	684 мкмоль/л
Фекалии, моча, мазки\соскобы из желудочно-кишечного тракта	Холестерин	13 ммоль/л
Мокрота, моча, мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии, аспираты, экссудаты	Гемоглобин	0,35 мг/мл
Мокрота, мазки\соскобы из дыхательных путей, мазки\соскобы из урогенитального тракта, аспираты	Слизь (муцин)	20%
Экзогенные вещества		
Мокрота, мазки\соскобы из дыхательных путей	Пиносол	2,0%
Мокрота, мазки\соскобы из дыхательных путей, мазки\соскобы из урогенитального тракта, эксудаты	Хлоргексидина биглюконат	5,0%
Фекалии, мазки\соскобы из желудочно-кишечного тракта	Индометацин суппозитории	5,0%
Мокрота, мазки\соскобы из дыхательных путей, аспираты	Ринофлуимуцил	5,0%
Мокрота, мазки\соскобы из дыхательных путей, мазки\соскобы из урогенитального тракта, аспираты, эксудаты	Октенисепт	2,0%
Мокрота, моча, мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии, аспираты, экссудаты, бактериальные культуры	Изопропиловый спирт	10%
Мокрота, моча, мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии, аспираты, экссудаты, бактериальные культуры	Метилацетат	10%

6.3 Предел обнаружения

Предел обнаружения для ДНК бактерий составляет 10 копий ДНК на амплификационную пробирку ($2{,}0 \times 10^3$ копий/мл препарата ДНК). Предел обнаружения

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

установлен путем анализа серийных разведений лабораторных контрольных образцов (ЛКО).

Предел обнаружения ДНК в образце биоматериала зависит от его вида и метода предобработки.

Предел обнаружения 10 копий ДНК на амплификационную пробирку соответствует следующим значениям концентрации в образце при использовании комплекта ПРОБА-НК-ПЛЮС для выделения нуклеиновых кислот производства ООО «НПО ДНК-Технология», ООО «ДНК-Технология ТС».

Материал	Предел обнаружения		
	Классы		
	Bacilli	Betaproteobacteria	Gammaproteobacteria
	10 копий/на амплификационную пробирку ($2{,}0x10^3$ копий/мл препарата ДНК)		
мокрота (предобработка с Na_3PO_4)	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец
мокрота (предобработка с муколизином)	$4x10^3$ копий на образец	$4x10^3$ копий на образец	$4x10^3$ копий на образец
моча	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец
мазки/соскобы из дыхательных путей	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец
мазки/соскобы из желудочно-кишечного тракта	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец
мазки/соскобы из урогенитального тракта	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец
фекалии	$8x10^2$ копий на образец	$8x10^2$ копий на образец	$8x10^2$ копий на образец
аспираты	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец
экссудаты	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец
бактериальные культуры	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец	$6x10^2$ копий на образец

6.4 Диагностические характеристики

Диагностические характеристики набора реагентов «БакСкрин УМП» рассчитаны в зависимости от наличия в образце ДНК микроорганизма, относящегося к одному из трех классов бактерий согласно назначению медицинского изделия).

Биоматериал	Количество образцов	Bacilli		Betaproteobacteria		Gammaproteobacteria	
		Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
Аспират	11	100% (15,81 – 100)	100% (88,78 – 100)	100% (15,81 – 100)	100% (88,78 – 100)	100% (71,51 – 100)	100% (84,56 – 100)
МДП	20	100% (76,84 – 100)	100% (92,29 – 100)	100% (15,81 – 100)	100% (93,84 – 100)	100% (59,04 – 100)	100% (93,28 – 100)
МЖКТ	11	100% (15,81 – 100)	100% (88,78 – 100)	100% (15,81 – 100)	100% (88,78 – 100)	100% (71,51 – 100)	100% (84,56 – 100)
Мокрота	12	100% (2,50 – 100)	100% (90,00 – 100)	100% (47,82 – 100)	100% (88,78 – 100)	100% (59,04 – 100)	100% (88,06 – 100)

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

Моча	65	100% (85,18 – 100)	100% (97,88 – 100)	100% (15,81 – 100)	100% (98,11 – 100)	100% (92,60 – 100)	100% (97,52 – 100)
СУГТ	9	100% (54,07 – 100)	100% (83,89 – 100)	100% (15,81 – 100)	100% (86,28 – 100)	100% (54,07 – 100)	100% (83,89 – 100)
Фекалии	8	100% (15,81 – 100)	100% (84,56 – 100)	100% (15,81 – 100)	100% (84,56 – 100)	100% (63,06 – 100)	100% (79,41 – 100)
Экссудат	8	100% (29,24 – 100)	100% (83,89 – 100)	100% (2,50 – 100)	100% (85,18 – 100)	100% (47,82 – 100)	100% (82,35 – 100)
Итого	144	100% (93,28 – 100)	100% (99,03 – 100)	100% (81,47 – 100)	100% (99,11 – 100)	100% (96,48 – 100)	100% (98,88 – 100)
Бактериальные культуры	46	100% (78,20 – 100)	100% (97,05 – 100)	100% (2,50 – 100)	100% (97,34 – 100)	100% (88,43 – 100)	100% (96,64 – 100)
Примечания	МДП – мазки/соскобы из дыхательных путей						
	МЖКТ – мазки/соскобы из желудочно-кишечного тракта						
	СУГТ – мазки/соскобы из урогенитального тракта						

В ходе проведенных клинических испытаний было установлено наличие в образцах биоматериала следующих видов бактерий (идентификация проведена до выявляемых набором реагентов таксонов):

Класс *Bacilli*: *Enterococcus avium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*;

Класс *Betaproteobacteria*: *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*;

Класс *Gammaproteobacteria*: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

6.5 Внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость

Оценка внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости набора реагентов проведена путём сравнения результатов, полученных при исследовании одних и тех же 16 образцов биоматериала по 25 показателям (выявляемым ДНК условно-патогенных бактерий классов *Bacilli, Betaproteobacteria и Gammaproteobacteria*).

Внутрисерийная воспроизводимость составляет 100% (95% доверительный интервал 99,08–100%).

Межсерийная воспроизводимость составляет 100% (95% доверительный интервал 99,08–100%).

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

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 52905-2007, методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные. При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

При работе с микроорганизмами III -IV групп патогенности выбор типа защитного костюма (рабочей одежды и средств индивидуальной защиты) проводится в строгом соответствии с СанПиН 3.3686-21 и определяется видом возбудителя, рабочей зоной, оснащением ее боксами биологической безопасности.

Следует использовать только одноразовые наконечники и пробирки. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

К работе с набором реагентов допускается персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Выделение ДНК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Подготовку к ПЦР с использованием набора реагентов возможно проводить в ПЦР-боксах.

Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится выделение ДНК и подготовка ПЦР-реактивов, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать с помощью бактерицидных установок в течение 30 минут.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники и др.) должны сбрасываться в контейнер для медицинских отходов, содержащий дезинфицирующий раствор (при необходимости).

ВНИМАНИЕ! Утилизировать отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации (МУ 1.3.2569-09).

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

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СанПиН 3.3686-21.

При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Опасные компоненты в наборе реагентов

Компонент набора реагентов	Наличие/отсутствие опасного компонента	Указание на риски
Смеси для амплификации, запечатанные парафином. Стрип №1	Нет опасных веществ	-
Смеси для амплификации, запечатанные парафином. Стрип №2	Нет опасных веществ	-
Раствор Taq-полимеразы	Нет опасных веществ	-
Минеральное масло	Нет опасных веществ	-
Положительный контрольный образец	**Азид натрия менее 0,1%**	является безопасным для конечного пользователя

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора реагентов;
- по истечению срока годности.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ в концентрациях, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

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

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- ПЦР-бокс («Бокс лабораторный с УФ лампой для проведения полимеразной цепной реакции БЛ-ПЦР» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № РЗН 2015/3193) или аналогичный);
- амплификатор детектирующий («ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229), «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10228), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2007/01250));
- микроцентрифуга-вортекс (BioSan, Латвия или аналогичная);
- холодильник (Стинол, Россия или аналогичный);
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналогичный);
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- дозаторы механические или электронные переменного объёма одноканальные, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 2,0 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл (Eppendorf, Германия или аналогичные);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл (Axygen, США или аналогичные);
- штатив для дозаторов;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька (неопудренные), текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующее средство.

Для взятия и предобработки материала для исследования и выделения нуклеиновых кислот требуются следующие оборудование и материалы:

- бокс биологической безопасности II класса;
- центрифуга для микропробирок, с RCF не ниже 16 000 x g;
- термостат твердотельный с таймером ТТ-2 «Термит» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2012/14090) или аналогичный, поддерживающий температуру до 65 °С;
- пробирки микроцентрифужные объёмом 1,5 мл с крышками, свободные от РНКаз и ДНКаз;
- электрический лабораторный аспиратор с колбой-ловушкой для удаления

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

надосадочных жидкостей;

- одноразовые наконечники без фильтра, свободные от РНКаз и ДНКаз, для электрического лабораторного аспиратора;
- микроцентрифуга-вортекс (BioSan, Латвия или аналогичная);
- дозаторы механические или электронные одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объём жидкости от 0,2 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 до 1000 мкл (Eppendorf, Германия или аналогичные);
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл (Axygen, США или аналогичные);
- штатив для дозаторов;
- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный (при необходимости);
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия или аналогичный);
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников и других расходных материалов;
- дезинфицирующее средство;
- транспортная среда (рекомендуется Транспортная среда СТОР-Ф (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2020/9640), Транспортная среда СТОР-М, (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, РУ № РЗН 2019/9453));
- набор/комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009» в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867).

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

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют биологический материал человека и бактериальные культуры из этого биоматериала (мокрота, моча, мазки/соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, фекалии, аспираты, экссудаты).

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортирование и предварительная обработка.

Примечание – Взятие, предварительную обработку, хранение и перевозку, передачу исследуемого материала в другие организации осуществляют согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-2009 и СанПиН 3.3686-21.

6.2 Взятие материала на исследование

6.2.1 Мокрота

Взятие материала осуществляют в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объёмом не менее 50 мл в количестве не менее 1,0 мл.

После сбора материала флакон плотно закрывают и маркируют.

6.2.2 Моча

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20–30 мл. Отбор мочи проводят в специальную сухую стерильную ёмкость объёмом до 60 мл, снабженную герметично завинчивающейся крышкой.

После сбора мочи контейнер плотно закрывают и маркируют.

6.2.3 Мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения в зависимости от источника биологического материала согласно установленной процедуре (например, Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб РУ № ФСЗ 2012/11835).

После взятия биологического материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований, и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания.

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

Извлеките зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

6.2.4 Фекалии

Для анализа используют пробы фекалий массой (объёмом) примерно 1–3 г (1–3 мл). Пробу переносят в специальный стерильный сухой флакон отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками.

После сбора фекалий флакон плотно закрывают и маркируют.

6.2.5 Аспираты

Взятие материала осуществляют в одноразовые, плотно завинчивающиеся стерильные пробирки объёмом 50 мл.

После взятия материала пробирку плотно закрывают крышкой и маркируют.

6.2.6 Экссудат

Взятие материала осуществляют с помощью специальных медицинских изделий, имеющих регистрационные удостоверения в зависимости от источника биологического материала согласно установленной процедуре (например, Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб РУ № ФСЗ 2012/11835).

После взятия биологического материала перенесите зонд в пробирку с транспортной средой, предназначенной производителем для транспортирования и хранения образцов биологического материала для ПЦР-исследований, и тщательно промойте его в жидкости в течение 10–15 с, избегая её разбрызгивания.

Извлеките зонд из раствора и, вращательным движением прижимая его к внутренней стенке пробирки выше уровня раствора, отожмите избыток жидкости. Полностью удалите зонд из пробирки и утилизируйте.

Плотно закройте крышку пробирки и промаркируйте пробирку.

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

6.2.7 Бактериальные культуры

Взятие материала с жидких и плотных сред осуществляется при помощи одноразовой микробиологической петли или шпателя. Поместите в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5-2,0 мл, в которую предварительно внесено 500 мкл стерильного физиологического раствора, одиночную колонию клеток или 100 мкл жидкой среды.

После взятия материала пробирку плотно закрывают крышкой и маркируют.

6.3 Транспортирование и хранение исследуемых образцов

6.3.1 Мокрота

Образцы мокроты допускается транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С– не более 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 3 суток.

6.3.2 Нативные и предварительно обработанные образцы мочи:

Нативные и предварительно обработанные образцы мочи допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более одних суток;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С – не более одной недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

6.3.3 Мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, экссудаты

Сроки хранения мазков\соскобов из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, экссудатов определяются инструкцией к рекомендуемому набору/комплекту реагентов для выделения ДНК.

6.3.4 Образцы нативных фекалий

Образцы нативных фекалий допускается транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С – не более 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 3 суток.

6.3.5 Аспират, бактериальные культуры:

Аспират, бактериальные культуры допускается транспортировать и хранить:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – не более одних суток;
- при температуре от минус 18 °С до минус 20 °С – не более одной недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

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

6.4 Подготовка биологического материала для исследования.

ВНИМАНИЕ! Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса ротора (Приложение А). Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.

6.4.1 Мокрота

6.4.1.1 Способ № 1

6.4.1.1.1 Перенесите в одноразовую пластиковую пробирку примерно 500 мкл биологического материала.

6.4.1.1.2 Добавьте к пробе мокроты равный объём 10 % трехзамещённого фосфорнокислого натрия x12H_2O, плотно закройте крышкой и интенсивно встряхните.

6.4.1.1.3 Инкубируйте смесь при температуре 37 °С в течение 18-24 часов, затем нейтрализуйте 1 М HCl до pH 6,8-7,4.

6.4.1.1.4 Центрифугируйте при 900 x g в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

6.4.1.1.5 Удалите надосадочную жидкость в ёмкость с 5 % раствором хлорамина для обеззараживания.

6.4.1.1.6 Добавьте к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешайте пипетированием и перенесите в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

6.4.1.1.7 Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

6.4.1.1.8 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

6.4.1.2 Способ № 2

6.4.1.2.1 Добавьте в контейнер с образцом муколизин в соотношении 5:1 (5 частей муколизина к одной части мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера.

6.4.1.2.2 Закройте крышку контейнера, встряхните содержимое и инкубируйте 20-30 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С), каждые 2-3 мин встряхивая контейнер.

6.4.1.2.3 Проведите выделение ДНК согласно инструкции к комплекту реагентов «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009» в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867).

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

6.4.2 Моча

6.4.2.1 Перенесите в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл 1,0 мл мочи.

6.4.2.2 Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

6.4.2.3 Наиболее полно удалите надосадочную жидкость.

6.4.2.4 Добавьте к осадку 1,0 мл стерильного физиологического раствора, перемешайте на микроцентрифуге-вортексе в течение 5-10 с.

6.4.2.5 Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

6.4.2.6 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

6.4.3 Мазки\соскобы из дыхательных путей, желудочно-кишечного и урогенитального тракта, аспираты, экссудаты, бактериальные культуры с жидких и плотных сред

6.4.3.1 Центрифугируйте пробирку при 16000 x g в течение 10 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

6.4.3.2 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

6.4.4 Фекалии

6.4.4.1 Перенесите в одноразовую пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл с 1,0 мл стерильного физиологического раствора примерно 250 мг (мкл) фекалий, закройте крышку пробирки.

6.4.4.2 Встряхните пробирку на микроцентрифуге-вортексе в течение 5-10 с.

6.4.4.3 Центрифугируйте пробирку при 900 x g в течение 2-3 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

6.4.4.4 Перенесите 800-1000 мкл надосадочной жидкости в новую одноразовую пробирку объёмом 1,5 мл, центрифугируйте при 16000 x g в течение 10 мин при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С).

6.4.4.5 Удалите надосадочную жидкость, оставив в пробирке 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

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

Дальнейшая обработка указанных выше видов биологического материала осуществляется согласно инструкции к комплекту реагентов «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009» в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867).

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

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК из исследуемого материала проводят в соответствии с инструкцией к используемому набору/комплекту реагентов.

Для выделения ДНК рекомендуется использовать «Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС) по ТУ 9398-035-46482062-2009» в форме комплектации: комплект ПРОБА-НК-ПЛЮС (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08867).

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор стерильный.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

ВНИМАНИЕ! Следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

7.2.1 Промаркируйте два стрипа со смесями для амплификации, запечатанными парафином (один Стрип №1 и один Стрип №2, всего 16 пробирок): для каждого исследуемого образца, для положительного контрольного образца (К+) и для отрицательного контрольного образца (К-).

Пример: Необходимо проанализировать два образца. Для этого необходимо промаркировать восемь стрипов: четыре для исследуемых образцов, два для «К+» и два для «К-» (таблица 2).

Таблица 2 – Пример маркировки стрипов для проведения ПЦР

Образец	Порядковый № стрипа	Тип стрипа
Образец А	1	Стрип №1
	2	Стрип №2
Образец Б	3	Стрип №1
	4	Стрип №2
К-	5	Стрип №1
	6	Стрип №2
К+	7	Стрип №1
	8	Стрип №2

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

7.2.2 Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Внесите в каждую пробирку промаркированных стрипов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.

7.2.4 Внесите в каждую пробирку промаркированных стрипов по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки стрипов.

7.2.5 Встряхните пробирки с препаратом ДНК, положительным контрольным образцом (К+) и отрицательным контрольным образцом (К-) в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром. Закрывайте стрипы плотно.

7.2.6 Внесите в каждую пробирку соответствующих промаркированных стрипов, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК. В стрипы, промаркированные «К+» и «К-», ДНК не вносится.

7.2.7 Внесите в каждую пробирку стрипов промаркированных «К+», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.8 Внесите в каждую пробирку стрипов промаркированных «К-», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.2.9 Центрифугируйте стрипы в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.10 Установите все стрипы в блок детектирующего амплификатора.

7.2.11 Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора в режиме «Работа с прибором». Укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение стрипованных пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 7.2.10) и проведите ПЦР по программе амплификации, приведённой в таблице 3.

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

Таблица 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт» и ДТ-96

№ блока	Температура °С	Мин.	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	…	…	Хранение		Хранение

Примечания:

1. Параметры, которые вводят при создании нового теста (программа амплификации, используемые каналы детекции, объём реакционной смеси и т.п.) можно сохранить в виде готового файла.
2. При последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР.

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

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

8.2 Учёт и регистрация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

8.3 После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов. На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла по всем используемым каналам, для каждой пробирки в термоблоке

После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. В этом случае необходимо проверить расположение стрипов в термоблоке (первая пробирка Стрип №1 и вторая пробирка Стрип №2 отмечены голубым буфером) и скорректировать идентификаторы пробирок в протоколе.

9 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

9.1 В образцах материала, содержащих ДНК выявляемых бактерий, во время проведения амплификации детектирующий амплификатор фиксирует положительные результаты амплификации специфических продуктов в соответствующих пробирках по соответствующим каналам детекции (см. таблицу 1).

После завершения ПЦР программа отображает в таблице в графе «Результат» «+».

9.2 В образцах материала, не содержащих ДНК выявляемых бактерий, при проведении амплификации детектирующий амплификатор фиксирует отрицательные результаты амплификации специфических продуктов в соответствующих пробирках по заявленным каналам детекции и положительный результат амплификации внутреннего контроля (пробирка №16 – без ВК).

После завершения ПЦР программа отображает в таблице в графе «Результат» «-».

9.3 Для отрицательного и положительного контрольных образцов должны быть получены результаты, приведённые в таблице 4.

При получении для положительного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии бракуют.

При получении для отрицательного контрольного образца результатов, отличающихся от указанных в таблице 4, результаты всей постановочной серии бракуют.

В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для выявления и устранения возможной контаминации.

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

Таблица 4 – Результаты исследования для отрицательного и положительного контрольных образцов

Стрип	№ пробирки	Канал детекции	Аналит	Положительный контрольный образец	Отрицательный контрольный образец
1	1	Fam	ОБМ	+	≤3,5 Lg
1	1	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
1	1	Rox	Маркер	+	+
1	2	Fam	*Streptococcus pyogenes*	+	-
1	2	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
1	3	Fam	*Citrobacter freundii*	+	-
1	3	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
1	3	Cy5	*Citrobacter koseri*	+	-
1	4	Fam	*Burkholderia* spp.	+	-
1	4	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
1	5	Fam	*Streptococcus pneumoniae*	+	-
1	5	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
1	5	Cy5	*Streptococcus* spp.	+	-
1	6	Fam	*Staphylococcus aureus*	+	-
1	6	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
1	6	Cy5	*Staphylococcus spp.*	+	-
1	7	Fam	*Klebsiella pneumoniae/ Klebsiella oxytoca*	+	-
1	7	Hex	*ВК*	Не учитывается	Ср <35
1	7	Cy5	*Klebsiella pneumoniae*	+	-
1	8	Fam	*Acinetobacter* spp.	+	-
1	8	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
2	9	Fam	*Enterobacter cloacae*	+	-
2	9	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
2	9	Cy5	*Serratia marcescens*	+	-
2	10	Fam	*Stenotrophomonas maltophilia*	+	-
2	10	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
2	10	Rox	Маркер	+	+
2	10	Cy5	*Haemophilus* spp.	+	-
2	11	Fam	*Haemophilus influenzae*	+	-
2	11	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
2	12	Fam	*Morganella morganii*	+	-
2	12	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
2	12	Cy5	*Enterobacteriales*	+	-
2	13	Fam	*Enterococcus* spp.	+	-
2	13	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
2	13	Cy5	КВМ	+	-
2	14	Fam	*Escherichia coli*	+	-
2	14	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
2	14	Cy5	*Pseudomonas aeruginosa*	+	-
2	15	Fam	*Streptococcus agalactiae*	+	-
2	15	Hex	ВК	Не учитывается	Ср <35
2	15	Cy5	*Proteus* spp.	+	-
2	16	Fam	*Achromobacter ruhlandii*	+	-
2	16	Cy5	*Achromobacter xylosoxidans*	+	-

9.4 В случае, если детектирующий амплификатор фиксирует отрицательный результат амплификации специфичных продуктов и отрицательный результат амплификации внутреннего контроля в той же пробирке – результат исследования оценивается как недостоверный (нд). Недостоверный результат может быть вызван

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

присутствием ингибиторов в препарате нуклеиновых кислот, полученном из биологического материала; ошибками преаналитического этапа, неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторное выделение препарата нуклеиновых кислот, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

9.5 При выявлении ДНК любого микроорганизма результат для ОБМ (общая бактериальная масса) должен быть положительным.

9.6 При выявлении следующих микроорганизмов: *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae\Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus* spp. должны быть выявлены более высокие таксономические ступени.

Если в пробе обнаружен	**должны быть выявлены следующие таксономические ступени**
Citrobacter freundii	*Enterobacteriales*
Citrobacter koseri	*Enterobacteriales*
Enterobacter cloacae	*Enterobacteriales*
Escherichia coli	*Enterobacteriales*
Haemophilus influenzae	*Haemophilus* spp.
Klebsiella pneumoniae	*Enterobacteriales, K.pneumoniae\K.oxytoca*
Klebsiella pneumoniae\Klebsiella oxytoca	*Enterobacteriales*
Morganella morganii	*Enterobacteriales*
Serratia marcescens	*Enterobacteriales*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus* spp.
Streptococcus agalactiae	*Streptococcus* spp.
Streptococcus pneumoniae	*Streptococcus* spp.
Streptococcus pyogenes	*Streptococcus* spp.
Proteus spp.	*Enterobacteriales*

Если это условие не соблюдается, то результат исследования интерпретируется как недостоверный (нд) и может быть связан с нарушениями в технологии амплификации или пробоподготовки. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

9.7 При отсутствии специфических положительных результатов и КВМ, отрицательный результат следует интерпретировать как недостаточное для исследования количество материала. В этом случае требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие биологического материала (выполняется последовательно).

ВНИМАНИЕ! Значение КВМ не учитывается в случае, если специфика исследуемого материала предрасполагает к следовому количеству ДНК человека или исследуемый материал не должен содержать ДНК человека (например, чистые культуры бактерий).

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

10 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

10.1 Транспортирование

10.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

10.1.2 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

10.2 Хранение

10.2.1 Набор реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.2 Смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

10.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

10.3 Указания по эксплуатации

10.3.1 Набор реагентов должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

10.3.2 Для получения достоверных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов.

10.3.3 После вскрытия упаковки компоненты набора реагентов следует хранить при следующих условиях:

– компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов;

– смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности набора реагентов.

10.3.4 Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

11 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

11.1 При использовании набора реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы класса В, которые утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 и МУ 1.3.2569-09.

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

11.2 Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

12 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

12.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

12.2 Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

13 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

13.1 Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

14 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Обратитесь к инструкции по применению
	Температурный диапазон	REF	Каталожный номер
Σ	Количество тестов		Адрес изготовителя
	Годен до	NON STERILE	Не стерильно
LOT	Серия набора		Одноразовое использование
	Дата изготовления		Не допускается воздействие солнечного света

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

15 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ Р 2.105-2019 Единая система конструкторской документации (ЕСКД). Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство (СРПП). Испытания и приемка выпускаемой продукции. Основные положения.

ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения.

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности для диагностики in vitro.

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечание – Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.

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

16 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС»; ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

Адрес производителя: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Место производства:

ООО «ДНК-Технология ТС»: Россия, 117246, г. Москва, Научный проезд, д. 20, стр.4.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов БакСкрин УПМ, следует обращаться по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, Варшавское шоссе, дом 125Ж, корпус 5, этаж 1, пом.12, тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru.

Служба клиентской поддержки:

8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

+7(495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Старший научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология»
к.б.н.

Артемова Л.В
«01» июля 2022 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач ГКБ №67
им. Л.А. Ворохобова ДЗМ
доктор медицинских наук, профессор

А.С. Шкода
«19» июля 2022 г.

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

Приложение А

(справочное)

Номограмма и формула перевода относительного ускорения центрифуги (RCF) в скорость вращения (RPM) в зависимости от диаметра ротора

