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

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для определения ДНК *Ureaplasma species*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
(РеалБест ДНК Ureaplasma species
(комплект 1))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«РеалБест ДНК *Ureaplasma species*»** для определения ДНК *Ureaplasma species (U.parvum и U.urealyticum)* 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 2»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 3»** и **«РеалБест экстракция 100»**.

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

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 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-полимеразой.

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

Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК возбудителя инфекции гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая 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'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сиг-

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

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

В анализируемых образцах дополнительно оценивается содержание ДНК гена *HMBS* человека с целью валидации качества забора материала.

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагментов ДНК *Ureaplasma species* и гена *HMBS* – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок.

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. **Чувствительность** – определение 100 копий ДНК *Ureaplasma species* и 250 копий ДНК гена *HMBS* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. **Специфичность** определения ДНК *Ureaplasma species* и ДНК гена *HMBS* (*по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов)* – 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 объёма, 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»).*

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

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;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой *(например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);*
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» *(фирма «Eppendorf», Германия);*
- пипетки полуавтоматические *(дозаторы механические)* одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками *(фирма «Ленпипет», Россия; 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 «FinnTip», Финляндия);*
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 0,2 мл *(фирма «Хеликон», Россия)*;
- контейнер для сброса отходов *(например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный).*

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 2», «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 в течение 2 суток.

ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °С в течение 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 контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО)* пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

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

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 при температуре хранения (2–8) °С составляет 3 месяца.

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

Внимание! *Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!*

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по **50 мкл** соответствующего **раствора выделенной ДНК**. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов **ДНК *Ureaplasma species*, ДНК гена *HMBS*** 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 *Ureaplasma species*, ДНК *HMBS***:

– для регистрации процесса амплификации **ДНК *HMBS*** следует выбрать канал детекции **«FAM».**

– для регистрации процесса амплификации **ДНК *Ureaplasma species*** следует выбрать канал детекции **«ROX»**.

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контрольными образцами 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 учёт результатов проводить в соответствии с **разделом 9** данной инструкции и **Приложениями.**

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В **ПКО** должно фиксироваться:

– нарастание сигнала амплификации **ДНК гена *HMBS*** человека *(канал «FAM»)* и определяться значение порогового цикла **Ct *HMBS***;

– нарастание сигнала амплификации **ДНК *Ureaplasma species*** *(канал «ROX»)* и определяться значение порогового цикла **Ct ПКО**.

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

9.2. В **ОКО** не должно фиксироваться нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «**ROX**», а также нарастание сигнала амплификации **ДНК гена *HMBS* человека** по каналу **«FAM» до 32 цикла**.

Если для ОКО значение **Ct** по каналу **«FAM» меньше или равно 32** или по каналу **«ROX» меньше или равно 40**, то это свидетельствует **о наличии контаминации**.

9.3. В **каждом исследуемом образце** должно фиксироваться нарастание сигнала амплификации **ДНК гена *HMBS* человека** *(канал «FAM»)* и определяться **Ct *HMBS***.

9.4. Анализируемый образец считается **отрицательным** *(не содержащим ДНК возбудителя инфекции)*, если для этого образца значение **Ct** по каналу «**ROX» больше 40 или не определяется.**

Если для такого образца значение **Ct** *HMBS* **больше 32 или не определяется**, то результат не подлежит учёту **как отрицательный**. Необходим повторный забор материала и повторный анализ данного образца.

9.5. Анализируемый образец считается **положительным,** т.е. содержащим ДНК возбудителя инфекции, если:

– для данного образца значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 40** и значение **Ct *HMBS* меньше 32**;

– для данного образца значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 40** и значение **Ct *HMBS* больше 32 или не определяется.**

Ct U.species	Ct HMBS	Интерпретация результата
< 40	< 32	Положительный
< 40	> 32	Положительный
> 40	< 32	Отрицательный
> 40	> 32	Необходим повторный забор материала

9.6. В случае контаминации ДНК *Ureaplasma species* (Ct_{ROX} *ОКО* ≤ 40) все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявле-нию и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной поста-новки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9.7. В случае контаминации ДНК гена *HMBS* (Ct_{FAM} *ОКО* ≤ 32) все отрицательные 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 отрицательный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал положительный результат, следует учитывать как положительные.

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.

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

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.

*По вопросам, касающимся качества набора **«РеалБест ДНК Ureaplasma species»**, 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.

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

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ.

Рассчитать концентрацию ДНК *Ureaplasma species* в исследуемых образцах с помощью программы **«РеалБест Диагностика»** или в соответствии с формулой:

$$\lg[C_{обр}] = 0{,}3 \times (Ct^{HMBS} - Ct^{U.\ species}) + 5{,}3.$$

Полученное значение соответствует десятичному логарифму концентрации ДНК *Ureaplasma species,* нормированной на 100 тыс. клеток человека.

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.

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.

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

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».

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		

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

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

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