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

ИНСТРУКЦИЯ
по применению Набора реагентов для количественной оценки
содержания ДНК человека в клинических образцах
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
(РеалБест Валидация образца
(комплект 1))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«РеалБест Валидация образца»** предназначен для количественной оценки содержания ДНК человека в клинических образцах *(эпителиальных соскобах)* с целью валидации качества их забора и повышения достоверности результатов определения ДНК возбудителей инфекций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

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

Набор рекомендуется использовать одновременно с наборами серии **«РеалБест»** для определения ДНК возбудителей инфекций в эпителиальных соскобах.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип валидации качества забора образца основан на количественной оценке содержания участка ДНК гена гидроксиметилбилан синтетазы *(HMBS)* человека в ПЦР-пробе, приготовленной из эпителиального соскоба с помощью наборов для выделения ДНК серии **«РеалБест»**. Количество выявляемой в ПЦР-пробе ДНК человека пропорционально количеству эпителиальных клеток в соскобе. Отрицательный результат выявления ДНК возбудителя инфекции в соскобе является достоверным при содержании в ПЦР-пробе не менее 250 копий *(геном-эквивалентов)* ДНК гена *HMBS*, что свидетельствует о качественном заборе клинического материала для исследования.

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) − 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 250 копий ДНК гена *HMBS* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. **Специфичность** определения ДНК гена *HMBS (по стандартной панели предприятия отрицательных экстрактов)* – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 *(Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н)*.

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»)*.

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», 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 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)*;
- встряхиватель для пробирок (Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью одного из наборов: «**РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 1»** или **«РеалБест экстракция 100»** согласно инструкции по применению соответствующего набора реагентов.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО, который является компонентом данного набора 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.

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

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 контрольные образцы: 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 при температуре (2–8) °С не более 3 месяцев.

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 дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести **50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК.** Не захватывать осадок! Плотно закрыть пробирки стрипированными крышками или заклеить оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК гена *HMB*S и 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 ВКО и гена *HMBS* человека**:

– для регистрации процесса амплификации **ДНК ВКО** следует выбрать канал детекции **«FAM»;**

– для регистрации процесса амплификации **ДНК гена *HMBS*** 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 **Приложением.**

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Общие условия учёта результатов.

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

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

– нарастание сигнала амплификации ДНК специфического продукта амплификации **ДНК гена *HMB*S** *(канал «ROX»)* и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**.

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

9.1.2. 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».**

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

9.1.4. Если для ОКО значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 33**, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В случае контаминации все результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки.

9.2. Оценка качества забора образца.

9.2.1. 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. Если для анализируемого образца значение **Ct** ВКО превышает значение (**Ct** ВКО)$_{ср}$ более чем на 2, то для корректной оценки качества забора материала необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.2.2. Если для анализируемого образца значение **Ct** ДНК гена *HMBS* по каналу **«ROX» меньше или равно 33** *(т.е. содержание ДНК гена HMBS в ПЦР-пробе не менее 250 копий)*, то качество забора образца может быть признано удовлетворительным, а результат определения в ней ДНК возбудителей инфекций при помощи наборов серии «**РеалБест**» – достоверным.

9.2.3. Если для анализируемого образца значение **Ct** ДНК гена *HMBS* по каналу **«ROX» больше 33 или не определяется**, то необходимо провести повторный забор образца для исследования.

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 **«РеалБест Валидация образца»** 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.

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

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

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.

Для наборов **«РеалБест РНК»:**
1 стадия: 45 °С – 30 минут;
2 стадия: 94 °С – 1 минута;
3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд, 60 °С – 20 секунд);*
Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Анализ и учёт результатов.

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

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

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

Графические символы

	Изготовитель		Дата изготовления
LOT	Код партии		Обратитесь к инструкции по применению
REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению.		Использовать до….
Σ_n	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
NON STERILE	Не стерильно		Не допускать воздействия солнечного света

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

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