«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

_____ М.Д. Хусаинов

«23» _____ 2022 г.

м.п.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Candida albicans* и общей ДНК грибов

методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

(РеалБест ДНК Candida albicans / Fungi

(комплект 1))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«РеалБест ДНК *Candida albicans*/Fungi»** предназначен для выявления ДНК *Candida albicans* и общей ДНК грибов (ДНК Fungi) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб *(соскобы эпителиальных клеток, бронхиальный секрет, сыворотка или плазма крови)* проводится с помощью наборов: **«РеалБест ДНК-экспресс»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 1»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 2»** и **«РеалБест экстракция 100».**

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

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 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 ДНК-полимеразой.

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

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

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

Учёт эффективности выделения ДНК *Candida albicans* и ДНК Fungi из образцов обеспечивается

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

выделением ДНК из клинических проб совместно с предварительно внесённым **внутренним контрольным образцом (ВКО)**.

2.2. Состав набора.

В состав набора входят следующие компоненты:

- положительный контрольный образец (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагментов ДНК ряда возбудителей микозов, в том числе ДНК *Candida albicans* и ДНК гена *5,8S рРНК*, консервативного для всех микроскопических грибов – 2 пробирки по 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** – выявление 1000 копий ДНК *Candida albicans* и ДНК Fungi в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. **Специфичность** выявления ДНК *Candida albicans* и ДНК Fungi (*по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов)* – 100%.

3.3. **Диагностическая чувствительность** выявления ДНК *Candida albicans*: клинические испытания, проведенные в двух независимых учреждениях на 55 образцах биологического материала *(соскобы эпителиальных клеток урогенитального тракта)*, полученных от пациентов с признаками микоза, показали 100% чувствительность *(интервал 95%–100%, с доверительной вероятностью 90%)*.

Диагностическая чувствительность выявления ДНК Fungi: клинические испытания, проведённые в двух независимых учреждениях на 60 образцах биологического материала *(соскобы эпителиальных клеток урогенитального тракта)*, полученных от пациентов с признаками микоза, показали 100% чувствительность *(интервал 94%–100%, с доверительной вероятностью 90%)*.

3.4. **Диагностическая специфичность** выявления ДНК *Candida albicans*: клинические испытания, проведённые в двух независимых учреждениях на 45 образцах биологического материала *(соскобы эпителиальных клеток урогенитального тракта)*, полученных от условно здоровых пациентов, показали 100% специфичность *(интервал 94%–100%, с доверительной вероятностью 90%)*.

Диагностическая специфичность выявления ДНК Fungi: клинические испытания, проведённые в двух независимых учреждениях на 40 образцах биологического материала *(соскобы эпителиальных клеток урогенитального тракта)*, полученных от условно здоровых пациентов, показали 100% специфичность *(интервал 95%–100%, с доверительной вероятностью 90%)*.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

4.2. 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/РНК 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.

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

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

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

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «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;
- 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 0,2 мл *(фирма «Хеликон», Россия)*;
- контейнер для сброса отходов *(например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный)*;
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала *(соскобы эпителиальных клеток, бронхиальный секрет, сыворотка или плазма крови)* с помощью наборов: **«РеалБест ДНК-экспресс»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 1»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 2»** и **«РеалБест экстракция 100»** согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

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

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

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

ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18–60) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

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

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

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

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 контроли)* 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 *Candida albicans*, ДНК Fungi и ДНК ВКО, и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации **ДНК *Candida albicans*, ДНК Fungi** и **ДНК ВКО**:

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

– для регистрации процесса амплификации **ДНК *Candida albicans*** следует выбрать канал детекции **«HEX»**;

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

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

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

нарастание сигнала амплификации **ДНК *Candida albicans*** *(канал «HEX»)* и определять значение порогового цикла **Ct** ПКО;

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

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

8.2. 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 каналам **«HEX»** и **«ROX»**.

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. 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.

9.2. Анализируемый образец считается **положительным**, содержащим **ДНК *Candida albicans***, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«HEX» меньше или равно 35**.

9.3. Анализируемый образец считается **положительным**, содержащим **ДНК Fungi**, если для этого образца значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 30.**

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

9.4. Результат анализа образца считается **отрицательным**, если для этого образца зна-чения **Ct** по каналу **«HEX» больше 35 или не определяются** и по каналу **«ROX» больше 30 или не определяются .**

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

9.5. Если для ОКО значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 30** или по каналу «**HEX» меньше или равно 35**, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9.6. При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» возможно использование программы **«РеалБест Диагностика»,** которая выполняет все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

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.

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

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

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 Candida albicans / Fungi»**, 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;

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

- 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

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

«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		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-71.

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