

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«23» 2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Candida krusei* и ДНК *Candida glabrata*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
(РеалБест ДНК *Candida krusei* / *Candida glabrata*
(комплект 1))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Candida krusei*/*Candida glabrata*» предназначен для выявления ДНК *Candida krusei* и ДНК *Candida glabrata* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб (*соскобы эпителиальных клеток, бронхиальный секрет, сы-воротка 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 krusei* и ДНК *Candida glabrata* гибридных 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 krusei* и ДНК *Candida glabrata* из образцов обеспечивается 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 krusei* и ДНК *Candida glabrata* – 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 100 копий ДНК *Candida krusei* и ДНК *Candida glabrata* в стандартных образцах предприятия – 100%.

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

3.3. **Диагностическая чувствительность** выявления ДНК *Candida krusei*: клинические испытания, проведенные в двух независимых учреждениях на 48 образцах биологического материала (*соскобы эпителиальных клеток урогенитального тракта*), полученных от пациентов с признаками микоза, показали 100% чувствительность (интервал 94%–100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Candida glabrata*: клинические испытания, проведенные в двух независимых учреждениях на 38 образцах биологического материала (*соскобы эпителиальных клеток урогенитального тракта*), полученных от пациентов с признаками микоза, показали 100% чувствительность (интервал 92%–100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.4. **Диагностическая специфичность** выявления ДНК *Candida krusei*: клинические испытания, проведенные в двух независимых учреждениях на 51 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 *Candida glabrata*: клинические испытания, проведенные в двух независимых учреждениях на 61 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.

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 объемом, со сменными наконечниками (фирма «Лентипет», 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 целфеновый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения (2–8) °C 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 krusei*, ДНК *Candida glabrata* 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 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК *Candida krusei*, ДНК *Candida glabrata* и ДНК ВКО:

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

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

– для регистрации процесса амплификации ДНК *Candida glabrata* 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 krusei* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

нарастание сигнала амплификации ДНК *Candida glabrata* (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 krusei*, если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» меньше или равно 35.

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

9.4. Результат анализа образца считается **отрицательным**, если для этого образца значения **Ct** по каналам «**HEX**» и «**ROX**» **больше 35 или не определяются**.

Если для такого образца значение **Ct** ВКО превышает значение $(Ct \text{ ВКО})_{cp}$ 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**» или «**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 krusei / Candida glabrata**», следует обращаться в АО «**Вектор-Бест**» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30;

тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77;

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:

- Набор реагентов предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом;
- При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (*утилизируются*) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов следует проводить по МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»;
- Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007;
- Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности;
- Транспортирование должно проводиться всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида.
- Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации;

- Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности;
- Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.
- Производитель обязуется за свой счёт заменить изделие, технические и функциональные характеристики (*потребительские свойства*) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Проведение анализа на приборе «ДТ-96» (НПО «ДНК-Технология»)

1. Настройка экспозиции измерений:

В режиме «Работа с прибором» в меню «Настройки» выберите пункт «Экспозиция измерений».

В открывшемся окне выберите канал «FAM», измените значение экспозиции на «250», для каналов «HEX» и «ROX» установите значение экспозиции «1000». Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав «ДА».

Внимание! Указанные значения экспозиций применимы только для наборов «РеалБест» и при необходимости должны быть изменены на исходные.

2. Программирование амплификатора:

2.1. Для создания протокола амплификации нажать кнопку «Создать» во вкладке «Запуск программы амплификации».

2.2. В открывшемся окне выбрать первый шаблон программы амплификации, отредактировать его в соответствии с программой амплификации к используемому набору:

Для наборов «РеалБест ДНК»:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

Для наборов «РеалБест РНК»:

1 стадия: 45 °C – 30 минут;

2 стадия: 94 °C – 1 минута;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

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 «K⁺» выставить «3», в ячейке «K⁻» – «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 спецификацию 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 (Cp).

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

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов		Не стерильно
	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.