

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2016 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК *Candida albicans* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

**«РеалБест ДНК *Candida albicans*»**

**(комплект 1)**

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов набора реагентов для выявления ДНК *Candida albicans* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Candida albicans*» предназначен для выявления ДНК *Candida albicans* 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» или «РеалБест экстракция 100».

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «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.

### 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

#### 2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле

*Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.*

ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции, который в ходе реакции связывается 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-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.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

## 2.2. Состав набора:

В состав набора входят следующие компоненты:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок).

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1,5 листа.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления ДНК *Candida albicans* определяется по стандартной панели предприятия отрицательных образцов ДНК-экстрактов, СПП (рег. № 05-2-291), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100 %;

3.2. Чувствительность определяется по пяти образцам с содержанием ДНК *Candida albicans* 100 копий в пробе, приготовленным из СОП ДНК *Candida albicans* (рег. № 05-2-311), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100 %;

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Candida albicans*: клинические испытания, проведенные на 94 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97 %-100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Candida albicans*: клинические испытания, проведенные на 94 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (ин-

тервал 97 %-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, исследующих 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 объема, 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. 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 реагентов следует проводить по 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: «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 («ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (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 2 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- нож канцелярский.

## 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» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать положительный контрольный образец универсальный (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 не менее 30 минут при температуре (18-25) °С.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

Положительный контрольный образец универсальный (ПКО) после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре от минус 18 до минус 60 °С не более 3 месяцев.



## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с готовой реакционной смесью для ПЦР (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 пленкой.

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

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

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 раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК *Candida albicans* 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 мин;

2 стадия: 95 °С – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 сек, 60 °С – 20 сек).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать канал детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК *Candida albicans*:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM».

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Candida albicans* 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 положительном контрольном образце универсальном (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла  $C_t$  ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Candida albicans* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла  $C_t$  *Candida albicans*.

8.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять  $C_t$  ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

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

## 9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить  $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$  как среднее значение  $C_t$  ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения  $C_t$  ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения  $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ . После отбраковки пересчитать  $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$  для оставшихся значений.

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

9.3. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение  $C_t$  по каналу «ROX» больше 35 или не определяется.

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

9.4. Если для ОКО значение  $C_t$  по каналу «ROX» 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.

## 10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, 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. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

## 11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет 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.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК Candida albicans», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: [plkobtk@vector-best.ru](mailto:plkobtk@vector-best.ru)

Начальник отделения  
ЗАО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству  
ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Проректор по научной работе  
ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России  
д.м.н., профессор  
м.п.

 Т.И. Пospelова





Пронумеровано, пронумеровано и  
скреплено печатью 4 листов.

Отв. за учет договоров НИР ГБОУ ВПО ИГМУ  
Минздрава России

Захарова Л.Н. Захарова Л.Н.

10 января 2016 г.

Информация получена с официального сайта

Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения

[www.goszdravnadzor.gov.ru](http://www.goszdravnadzor.gov.ru)



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2016 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК *Candida albicans* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

**«РеалБест ДНК *Candida albicans*»**

(комплект 2)

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов набора реагентов для выявления ДНК *Candida albicans* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Candida albicans*» предназначен для выявления ДНК *Candida albicans* 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» или «РеалБест экстракция 100».

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия), так и планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные.

### 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

#### 2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-

*Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.*

матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции, который в ходе реакции связывается 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-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.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

#### 2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок, каждая на 10 определений;
- раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона (по 2,0 мл).

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления ДНК *Candida albicans* определяется по стандартной панели предприятия отрицательных образцов ДНК-экстрактов, СПП (рег. № 05-2-291), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%;

3.2. Чувствительность определяется по пяти образцам с содержанием ДНК *Candida albicans* 100 копий в пробе, приготовленным из СОП ДНК *Candida albicans* (рег. № 05-2-311), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%;

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Candida albicans*: клинические испытания, проведенные на 94 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97 %-100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Candida albicans*: клинические

испытания, проведенные на 94 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97 %-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, исследующих 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 объема, 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. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Са-

нитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по 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 роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия) или планшетного типа: «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 «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 2 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма «Ахуген», США, кат. № PCR-02-С или аналогичные).

## 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» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать положительный контрольный образец универсальный (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 не менее 30 минут при температуре (18-25) °С.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.



Положительный контрольный образец универсальный (ПКО) после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре от минус 18 до минус 60 °С не более 3 месяцев.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку, отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с реакционной смесью для ПЦР (РС) и выдержать их при температуре (18-25) °С в течение 30 минут.

**Внимание!** 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС упаковать в целфленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

В пробирку с РС добавить 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при температуре (18-25) °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

Восстановленную РС хранить при температуре (2-8) °С не более 7 суток.

7.2. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постанровка ПЦР должна содержать 1 ОКО и 1 ПКО.

**Внимание!** Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.3. Во все пробирки пипеткой с наконечником с фильтром внести по 25 мкл реакционной смеси для ПЦР (РС).

7.4. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. Плотно закрыть пробирки крышками.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации ДНК специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК *Candida albicans* детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

– для приборов «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»:

1 стадия: 50 °С – 2 мин;

2 стадия: 95 °С – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 сек, 60 °С – 40 сек);

– для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 50 °С – 2 мин;

2 стадия: 95 °С – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 сек, 60 °С – 20 сек);

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °С.

7.8. Выбрать канал детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК *Candida albicans*:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Candida albicans* следует выбрать канал детекции «ROX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).

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

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

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. В положительном контрольном образце универсальном (ПКО) программа должна фиксировать:

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

– нарастание сигнала амплификации ДНК *Candida albicans* (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла *Ct* *Candida albicans*;

8.2. В отрицательном контрольном образце (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»/«Orange».

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

## 9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить  $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$  как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения  $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ . После отбраковки пересчитать  $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$  для оставшихся значений.

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

9.3. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» больше 35 или не определяется.

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

9.4. Если для ОКО значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» 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.

## 10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, 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. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

## 11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет 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.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК *Candida albicans*», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: [plkobtk@vector-best.ru](mailto:plkobtk@vector-best.ru)

Начальник отделения  
ЗАО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству  
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Проректор по научной работе  
ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России  
д.м.н., профессор  
м.п.

Т.И. Поспелова







Проставлено, пронумеровано и  
скреплено печатью 8 листов.

Отв. за учет договоров НИР ГБОУ ВПО НГМУ  
Минздрава России

Захарова Л.Н. Захарова Л.Н.

10 января 2016 г.

Информация получена с официального сайта  
Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения  
[www.gosdramnadzor.gov.ru](http://www.gosdramnadzor.gov.ru)