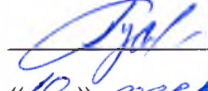


«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»


«10» *сентября* 2017 г. М.Д. Хусаинов



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для дифференциального выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum*/Ureaplasma parvum»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum*/Ureaplasma parvum» предназначен для дифференциального выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинического материала 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 применяется 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 образцы.

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 реги-

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

страции процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибрида-зационного 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 Таq-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 клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

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

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Ureaplasma urealyticum* (СОП 05-2-314), с содержанием ДНК *Ureaplasma urealyticum* 100 копий в пробе – 100%.

Чувствительность выявления ДНК *Ureaplasma parvum* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Ureaplasma parvum* (СОП 05-2-348), с содержанием ДНК *Ureaplasma parvum* 100 копий в пробе – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Ureaplasma parvum* (СОП 05-2-348), с содержанием ДНК *Ureaplasma parvum* 100 копий в пробе – 100%.

Специфичность выявления ДНК *Ureaplasma parvum* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Ureaplasma urealyticum* (СОП 05-2-314), с содержанием ДНК *Ureaplasma urealyticum* 100 копий в пробе – 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum*: кли-

нические испытания, проведенные на 47 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 93,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Ureaplasma parvum*: клинические испытания, проведенные на 75 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 96,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum*: клинические испытания, проведенные на 130 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Ureaplasma parvum*: клинические испытания, проведенные на 113 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,4 % - 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 дозаторов перемного 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 дозаторов.

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 дезинфи-

цирующими 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 (например, «ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (например, фирма «Eppendorf», Германия);

– встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «FinnTir», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);

– нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Материалом для определения ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum* служат соскобы слизистых оболочек урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры).

Подготовку образцов соскобов проводить в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

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 ПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

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

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. 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 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 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.

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. 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!

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК возбудителей инфекции и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.5. 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.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК возбудителей инфекции:

«FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«HEX» – для регистрации сигнала ДНК *Ureaplasma urealyticum*;

«ROX» – для регистрации сигнала ДНК *Ureaplasma parvum*.

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

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Ureaplasma urealyticum* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Ureaplasma parvum* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО.

8.1.2. 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 «HEX» и по каналу «ROX».

Если для ОКО значение Ct по каналу «HEX» и/или «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4.).

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

8.2. Учёт результатов.

8.2.1. 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.

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значения Ct по каналам «HEX» и «ROX» больше 40 или не определяются.

Если для такого образца значение $Ct\ ВКО$ превышает значение $(Ct\ ВКО)_{ср}$ 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 ДНК.

8.2.3 Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Ureaplasma urealyticum*, если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» меньше или равно 40.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Ureaplasma parvum* в клинически значимой концентрации, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 32.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Ureaplasma parvum* в клинически незначимой концентрации, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 32, но меньше или равно 40.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. 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.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

10.3. 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.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

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

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор
м.п.



Т.И. Пospelова



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н.

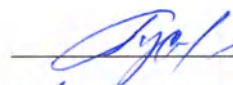
10 февраля 2017



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»


М. Д. Хусайнов
«10» февр. 2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для дифференциального выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum*/*Ureaplasma parvum*»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum*/*Ureaplasma parvum*» предназначен для дифференциального выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинического материала 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 применяется 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 образцы.

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 АО «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 клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Ureaplasma urealyticum* (СОП 05-2-314), с содержанием ДНК *Ureaplasma urealyticum* 100 копий в пробе – 100%.

Чувствительность выявления ДНК *Ureaplasma parvum* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Ureaplasma parvum* (СОП 05-2-348), с содержанием ДНК *Ureaplasma parvum* 100 копий в пробе – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Ureaplasma parvum* (СОП 05-2-348), с содержанием ДНК *Ureaplasma parvum* 100 копий в пробе – 100%.

Специфичность выявления ДНК *Ureaplasma parvum* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Ureaplasma urealyticum* (СОП 05-2-314), с содержанием ДНК *Ureaplasma urealyticum* 100 копий в пробе – 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum*: кли-

нические испытания, проведенные на 47 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 93,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Ureaplasma parvum*: клинические испытания, проведенные на 75 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 96,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum*: клинические испытания, проведенные на 130 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Ureaplasma parvum*: клинические испытания, проведенные на 113 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,4 % - 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 дозаторов 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 дозаторов.

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 дезинфи-

цирующими 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 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;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (например, фирма «Eppendorf», Германия);

– встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «FinnTip», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, 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 другие, подходящие к используемому амплификатору).

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Материалом для определения ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum* служат соскобы слизистых оболочек урогенитального тракта (цервикального канала, влагалища, уретры).

Подготовку образцов соскобов проводить в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

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 ПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

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

6.2. Подготовка реагентов.

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

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 определений.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС упаковать в 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.

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

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.

6.2.3. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая контрольные образцы).

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

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

7.2. Во все пробирки дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по 25 мкл РС.

7.3. В каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром. Плотнo закрыть пробирки крышками.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК возбудителей инфекции и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 40 секунд);

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

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 для всех приборов проводить при 60 °C.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК возбудителей инфекции:

«FAM» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«HEX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96»), «JOE» (для прибора «Rotor-Gene 3000»), «Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК *Ureaplasma urealyticum*;

«ROX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК

Ureaplasma parvum.

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

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Ureaplasma urealyticum* (канал «HEX»/«JOE»/«Yellow») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Ureaplasma parvum* (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО.

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» и по каналу «ROX»/«Orange».

Если для ОКО значение C_t по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» и/или «ROX»/«Orange» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4).

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

8.2. Учёт результатов.

8.2.1. 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.

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значения C_t по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow» и «ROX»/«Orange» больше 40 или не определяются.

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 ДНК.

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Ureaplasma urealyticum*, если для этого образца значение Ct по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» меньше или равно 40.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Ureaplasma parvum* в клинически значимой концентрации, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 32.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Ureaplasma parvum* в клинически незначимой концентрации, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» больше 32, но меньше или равно 40.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. 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.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

10.3. 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.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

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

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

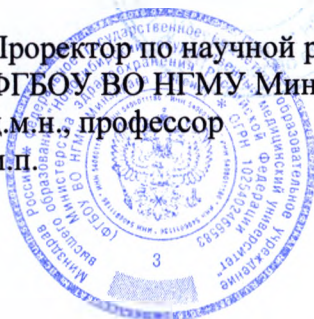
Начальник отделения
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор
м.п.



Т.И. Пospelова



Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н.

“10” февраля 2017 г.



УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 27.05.2010, №
4286-Пр/10

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека
В.И.Покровский
«15» июня 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов
для экстракции ДНК экспресс-методом

«ЭДЭМ»

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА	3
СОСТАВ	3
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	4
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	4
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	5
ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	5
ПРОЦЕДУРА ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	6
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	7
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	8
определена.10	Ошибка! Закладка не

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ИППП	- инфекции, передаваемые половым путем
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ТС	- транспортная среда
ВКО	- внутренний контрольный образец
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ФЕР	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов для Экстракции ДНК Экспресс-Методом (ЭДЭМ) предназначен для обработки различных типов клинического материала: соскобного отделяемого и мазков со слизистых оболочек урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы глаз, эрозивно-язвенных элементов слизистых и кожи, а также из образцов первой порции мочи¹ человека с целью последующего исследования на наличие ДНК возбудителей ИППП и других инфекций органов репродукции методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с использованием комплектов реагентов производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Клинический материал, полученный от пациента, помещается в транспортную среду ТС-ЭДЭМ, в которой хранится и транспортируется в лабораторию. Для экстракции ДНК аликвота клинического образца переносится в пробирку с «ВКО-дилуэнт», после чего подвергается термической обработке, в процессе которой происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. С помощью последующего центрифугирования нерастворимые компоненты осаждаются на дне пробирки, а супернатант, содержащий ДНК, используется для проведения ПЦР. Находящийся в реактиве «ВКО-дилуэнт» внутренний контрольный образец (ВКО) проходит процедуру экстракции одновременно с ДНК, содержащейся в клиническом материале, и, таким образом, является маркером качества лабораторного исследования клинического образца.

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА

Комплект реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

¹ Для образцов мочи требуется предварительная обработка.

Форма 1 комплект реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ».

СОСТАВ

Комплект реагентов «ЭДЭМ» – комплект реагентов для экстракции ДНК экспресс-методом «ЭДЭМ» включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Транспортная среда ТС-ЭДЭМ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	100 пробирок
ВКО-Дилуент	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	100 пробирок

К комплекту прилагается реагент:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-буфер-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов мазков и соскобного отделяемого, включая контроли. Для экстракции ДНК из образцов мочи необходимо использовать дополнительный реагент – транспортную среду «ТС-ЭДЭМ» (50 мл).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Форма 1: REF K2-17-100 / VER 12.03.10 / стр. 4 из 9

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».
- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Бокс биологической безопасности (бокс абактериальной воздушной среды) 2 класса защиты.
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16000 об/мин.
4. Центрифуга/вортекс.
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20, от 20 до 200 мкл).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
7. Штативы для микропробирок объемом 1,5 и 2,0 мл.
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
10. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Процедура взятия клинического материала проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

ВНИМАНИЕ! Взятие клинического материала (кроме мочи²) производится только в пробирки с транспортной средой ТС-ЭДЭМ, входящей в состав набора реагентов «ЭДЭМ».

Получение соскобного отделяемого и мазков со слизистых оболочек

² Для образцов первой порции мочи требуется предварительная обработка

Форма 1: REF K2-17-100 / VER 12.03.10 / стр. 5 из 9

урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы глаз, эрозивно-язвенных элементов слизистых и кожи.

1. Открыть пробирки с **ТС-ЭДЭМ**, предварительно стряхнув капли жидкости со стенок и внутренней части крышки на дно пробирки.
2. Погрузить рабочую часть зонда с клиническим материалом в транспортную среду **ТС-ЭДЭМ** и, отломив её в области насечки (если имеется), оставить в пробирке. В случае отсутствия насечки, погрузить рабочую часть зонда в среду, и прижав ее к внутренней стенке пробирки, вращать зонд 5-10 с, после чего зонд удалить. Пробирку плотно закрыть.

Клинический материал, помещенный в транспортную среду **ТС-ЭДЭМ** в плотно закрытой пробирке можно транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре (от +18 до +25 °С) не более 48 ч;
- при температуре от +2 до +8 °С не более 14 сут;
- для более длительного хранения образцы заморозить при температуре минус 20°С и ниже.

Получение первой порции мочи

Получают первую порцию утренней мочи в количестве 15-25 мл в специальный сухой стерильный флакон на 50 мл.

Образцы мочи можно транспортировать и хранить:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА (требуется только для мочи)

1. Взболтать флакон с мочой.
2. В пробирку с транспортной средой **ТС-ЭДЭМ** (0,5 мл) внести **1 мл** мочи, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром.
3. Центрифугировать пробирки, содержащие **ТС-ЭДЭМ** и мочу, при **12 тыс об/мин** в течение **5 мин** для получения осадка.
4. Не затрагивая осадок, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.
5. Добавить в каждую пробирку с осадком мочи **0,5 мл ТС-ЭДЭМ**, используя для каждой пробы отдельный наконечник. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе, чтобы ресуспендировать осадок, и осадить капли со стенок пробирки и внутренней части крышки кратким

центрифугированием при 1,5-3 тыс об/мин в течение 2-3 с.

6. Полученные образцы осадка мочи в транспортной среде **ТС-ЭДЭМ** использовать для проведения процедуры экстракции ДНК, как описано выше.

Полученные образцы осадка мочи в транспортной среде **ТС-ЭДЭМ** можно хранить:

- при комнатной температуре (от +18 до +25 °С) не более 48 ч;
- при температуре от +2 до +8°С не более 14 сут;
- для более длительного хранения образцы заморозить при температуре минус 20°С

и ниже.

ПРОЦЕДУРА ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

1. Включить термостат и установить температуру 95 °С.
 2. Подготовить и расставить в штативе необходимое количество пробирок с реактивом **ВКО-Дилуэнт** и промаркировать их. Осадить капли раствора со стенок пробирки и внутренней части крышки кратким центрифугированием при 1,5-3 тыс об/мин в течение 2-3 с.
 3. Перед проведением процедуры экстракции ДНК перемешать на вортексе содержимое пробирок с клиническим материалом в транспортной среде **ТС-ЭДЭМ** и осадить капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки центрифугированием при 1,5-3 тыс об/мин в течение 2-3 с. Расставить подготовленные пробирки в штативе.
 4. Перенести по **100 мкл** клинического материала в транспортной среде **ТС-ЭДЭМ** в подготовленные пробирки с **ВКО-Дилуэнт**ом, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром. В пробирку отрицательного контроля выделения («В-») внести **100 мкл** транспортной среды **ТС-ЭДЭМ**.
 5. Пробирки плотно закрыть, аккуратно, не разбрызгивая, перемешать содержимое на вортексе, и поместить в термостат на **5 мин** при **95 °С**.
- ВНИМАНИЕ!** Если пробирки неплотно закрыты, то может произойти открывание пробирок во время прогревания.
6. После окончания инкубации поместить пробирки в настольную центрифугу и центрифугировать при **14 тыс об/мин** в течение **1 мин**. Полученные таким образом пробы ДНК готовы к проведению последующей ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Пробы ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С или в течение года при температуре не выше минус 16 °С (при повторном ПЦР-исследовании проб ДНК, содержимое пробирок необходимо перемешать на вортексе и повторить центрифугирование в соответствии с п.6).

ВНИМАНИЕ! При проведении ПЦР-исследования полученных проб ДНК с помощью комплектов реагентов вариант FER для приготовления пробирки «Фон» следует использовать реагент ПЦР-буфер-Фон, прилагаемый к комплекту реагентов «ЭДЭМ». Пробирку «Фон» подготавливают следующим образом: в пробирку с ПЦР-смесью-1 на прослойку воска внести 10 мкл реагента ПЦР-буфера-Фон, затем внести 10 мкл пробы отрицательного контроля выделения («В-»), обработанной в соответствии с данной инструкцией.

ВНИМАНИЕ! В случае получения невалидного или сомнительного результата ПЦР-исследования с использованием комплекта реагентов «ЭДЭМ» необходимо повторно провести процедуру экстракции ДНК. Для этого 100 мкл клинического материала в транспортной среде ТС-ЭДЭМ следует обработать с помощью комплекта «ДНК-сорб-АМ» согласно инструкции к этому набору.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Комплект реагентов транспортировать при температуре от 2 до 25 °С не более 7 сут.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. Транспортную среду ТС-ЭДЭМ можно хранить не более 14 сут при температуре до 25 С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество комплекта реагентов «ЭДЭМ» направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: obtk@pcr.ru) и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс®» можно оставить, заполнив анкету потребителя на сайте www.amplisens.ru.

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний

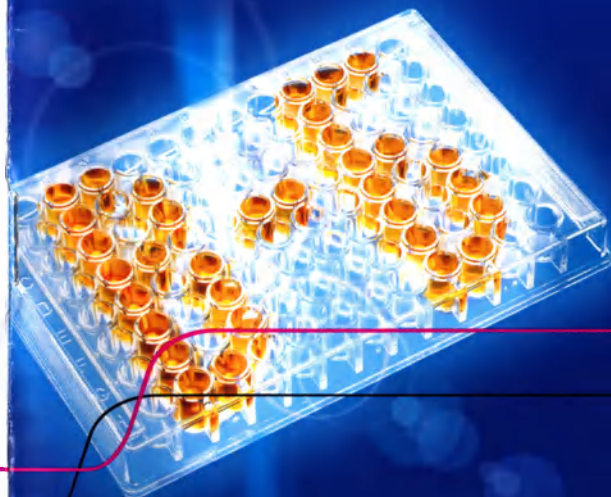


Г.М.Игнатьев

Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора

БЕКТОР

БЕСТ



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

БЕКТОР



Набор реагентов
для выделения ДНК
из клинических образцов

РеалБест ДНК-экспресс

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Утверждена 21.11.2014

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» (далее по тексту – набор) предназначен для транспортировки биопроб и выделения ДНК из соскобов эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, влагалища, ротоглотки, конъюнктивы глаза, а также спермы, слюны и мочи человека.

1.2. Набор может быть применён в клинической практике при диагностике различных инфекционных заболеваний человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.3. Набор рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов, включая контрольные образцы.

1.4. Набор адаптирован только для применения с ПЦР-наборами серии «РеалБест» для выявления ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

1. Принцип действия.

Набор «РеалБест ДНК-экспресс» содержит комплект готовых для применения пробирок с расфасованным транспортным раствором и пробирок с расфасованным лизирующим раствором.

Пробирки с транспортным раствором предназначены для забора и транспортировки биологических проб. Лизирующий раствор – это компонентный раствор, содержащий **внутренний контрольный образец (ВКО)**.

После того, как биологическая проба в транспортном растворе доставляется в лабораторию, часть её переносится в пробирку с лизирующим раствором. Прогрев пробы при 98 °С в лизирующем растворе приводит к лизису клеток, в результате ДНК попадает в раствор. После этого проба готова к постановке реакции ПЦР.

При планировании выделения ДНК следует предусмотреть, чтобы при каждом выделении ДНК с биологическими пробами процедуру выделения проходили **отрицательный контрольный образец (ОКО)** и **положительный контрольный образец (ПКО)**, который является компонентом наборов серии «РеалБест» для анализа.

2.2. Состав набора.

В состав набора входят:

- транспортный раствор – 100 пробирок по 300 мкл;
- лизирующий раствор с ВКО – 100 пробирок по 500 мкл;
- отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 фл. по 1 мл.

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Тест на отсутствие ингибирования по четырём отрицательным биопробам из СОП 05-2-440 – 100%. Набор соответствует техническим условиям по критерию отсутствия ингибирования, если во всех четырёх биопробах (100%) определяется наличие ВКО (*значение Ct ВКО по каналу «FAM» меньше или равно 40*).

3.2. **Эффективность выделения ДНК** *Mycoplasma hominis* – 100%. Эффективность выделения ДНК *Mycoplasma hominis* определяется по четырём образцам с концентрацией 100 копий в пробе, приготовленным из лиофилизированной смеси, содержащей ДНК *Mycoplasma hominis* из СОП 05-2-440, как процентное содержание образцов, определённых как положительные при ПЦР-анализе.

3.3. **Эффективность выделения ДНК**, определённая на 95 положительных образцах соскобов эпителиальных клеток урогенитального тракта, ротоглотки, конъюнктивы глаза, а

С-8899

образцов спермы, слюны и мочи – 100%
оценки 97%–100%, с достоверной вероят-
ностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение описан-
ных ниже требований может привести к
искажению результатов ПЦР.

1. Потенциальный риск применения на-
бора класса 1 (*Приказ МЗ РФ от 06.06.2012*

2. При работе с набором следует соблю-
дать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с
организмами III–IV групп патогенности
(опасности) и возбудителями паразитарных бо-
лезней».

3. Для предотвращения контаминации
необходимо территориально разделять этапы
выделения ДНК и постановки ПЦР согласно
СП 1.3.2569-09 «Организация работы лабора-
торий, использующих методы амплификации
нуклеиновых кислот при работе с материалом,
содержащим микроорганизмы I–IV групп пато-
генности».

4. При работе с набором следует надевать
стерильные медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть
снабжено собственным набором пипеток пере-
менного объема, необходимыми вспомога-
тельными материалами и оборудованием. Запрещается
их перемещение между рабочими местами.

4.6. Выделение ДНК следует проводить в
ламинарных боксах II класса защиты с вклю-
ченным ламинарным потоком.

4.7. Для выделения ДНК необходимо ис-
пользовать **только одноразовые** наконечники
с фильтром.

4.8. Не допускается использование одних
и тех же наконечников при добавлении разных
образцов.

4.9. После окончания работ для дезин-
фекции и предотвращения контаминации все
рабочие поверхности и оборудование следует
подвергнуть действию бактерицидных УФ
ламп в течение 1 часа. Затем обработать регла-
ментированными санитарными правилами де-
зинфицирующими средствами (*такими, как:*
0,2% раствор «ДП-2Т»; 1–3% раствор «Диабак»;
0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Ми-
страль»; 0,5–2% раствор «Велтолен»).

4.10. Все использованные одноразовые ма-
териалы подвергать обработке дезинфицирую-
щими средствами с последующей утилизацией

У-287-113-00 «Методические указания по бекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

11. 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

Ламинарный бокс 2 класса биологической безопасности (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВн-01-«Ламинар-с», фирма «Ламинные системы», Россия или аналогичный);

Термостат бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;

Центрифуга типа «Eppendorf» с максимальной скоростью вращения не менее 8000 об/мин («Eppendorf», Германия или аналогичная);

Вихревой смеситель для пробирок вихревой типа «Bio-Vortex V-1 plus», фирма «BioSan», Латвия);

- термостат, обеспечивающий нагрев до 98 °С («Thermo Shaker TS-100 с блоком SC20N», фирма «BioSan», Латвия или аналогичный);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками («Biohit», Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые, нестерильные, неопудренные, латексные или нитроновые (перчатки «NeoTouch», «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);
- штатив для микропробирок вместимостью 1,5 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов («Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

1. Подготовка соскобов эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала, уретры, влагалища, ротоглотки, конъюнктивы глаза и др.

Исследуемый материал, забранный с помощью неспиртовых стерильных зондов, перенести в пробирку с транспортным раствором. Тщательно перемешать. Оставить зонд в пробирке, оставив в зоне насечки, либо извлечь зонд, тщательно отжав остатки жидкости о стенку пробирки (*использованный зонд выбросить в контейнер с дезинфицирующим раствором*), и плотно закрыть. Проба готова к проведению выделения (п. 7.1).

2. Подготовка образцов слюны и спермы.

При работе с образцами слюны или спермы отобрать **300 мкл образца** в пробирку с транспортным раствором, тщательно перемешать на месте в течение 10 секунд. Проба готова к проведению выделения (п. 7.1).

3. Подготовка образцов мочи.

Для проведения ПЦР анализа используется порция утренней мочи, забранная в специальный пластиковый контейнер.

6.3.1. Отобрать необходимое количество пробирок с транспортным и лизирующим раствором (*по числу подготовленных имеющихся проб мочи*). Промаркировать пробирки с транспортной средой, установить в штатив.

6.3.2. Мочу в контейнерах аккуратно перемешать.

6.3.3. Отобрать по **1 мл проб**, перенести в соответствующие пробирки с транспортным раствором, используя наконечники с аэрозольным барьером.

6.3.4. Пробирки плотно закрыть крышками и тщательно перемешать содержимое на вортексе в течение 10 секунд.

6.3.5. Перенести пробирки в центрифугу и центрифугировать при 8000 об/мин при комнатной температуре в течение 5 минут.

6.3.6. Перенести пробирки в штатив, из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (*или вакуумным отсасывателем*) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

6.3.7. При получении большого количества осадка промыть его, добавив **500 мкл транспортного раствора**. Повторить процедуру перемешивания, центрифугирования и отбирания надосадочной жидкости (см. п. 6.3.4–6.3.6).

6.3.8. В каждую пробирку с осадком клеток перенести полностью весь объём (**500 мкл**) **рас-**
С-8899

а из соответствующей пробирки с лизирующим раствором.

6.3.9. Тщательно перемешать на вортексе в течение 10 секунд. Проба готова к процедуре выделения (п. 7.7).

6.3.10. Транспортировать и хранить образцы эпителиальных клеток, а также образцы слюны, спермы и мочи следует:

- при температуре (18–25) °C не более 2 часов;

- при температуре (2–8) °C не более 1 суток;

- при температуре минус (18–60)°C не более 2 недель.

6.4. Подготовка компонентов набора.

Извлечь из набора для ПЦР серии «Реал-Г» флакон с ПКО.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

Перед началом работы необходимо достать пробирку из холодильника и выдержать при температуре (18–25) °C не менее 30 минут.

Внимание! Для образцов мочи проводить выделение нуклеиновых кислот, начиная с п. 7.7.

7.1. Отобрать необходимое количество

ирс  000 ЦИРМИ  INFO@CIRMI.RU  WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

C-8899

подготовленных проб, включая ПКО и ОКО). Промаркировать пробирки, установить их в штатив.

7.2. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок с транспортным раствором, содержащим анализируемый материал.

7.3. В пробирки, содержащие лизирующий раствор, внести по **100 мкл пробы***, используя наконечники с аэрозольным барьером.

**Перед внесением пробы аккуратным пипетированием ресуспендировать осадок из клеток, полученный в пробирке с транспортной средой после центрифугирования, чтобы в выделения попала суспензия клеток.*

7.4. В пробирку положительного контроля выделения внести **100 мкл ПКО**.

7.5. В пробирку отрицательного контроля выделения внести **100 мкл ОКО**.

7.6. Пробирки плотно закрыть крышками и тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10 секунд.

7.7. Поместить пробирки в предварительно прогретый до 98 °C термостат и прогреть при температуре 98 °C в течение 15 минут.

7.8. После прогрева пробирки необходимо охладить до температуры (18–25) °C, перенести в центрифугу и центрифугировать при 8000 об/мин при температуре (18–25) °C в течение 1 минуты.

7.9. Полученный в результате центрифугирования супернатант использовать в качестве тестируемого образца ДНК для постановки амплификации.

Внимание! Выделенная ДНК может храниться при температуре (2–8) °C не более 24 часов.

УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1. Транспортирование наборов должно проводиться при температуре (2–8) °C. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °C не более 10 суток.

Замораживание компонентов набора не допускается.

8.2. Набор реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» должен храниться в упаковке производителя-изготовителя при температуре (2–8)°C в течение всего срока годности (12 месяцев).

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

Набор адаптирован только для применения с ПЦР-наборами серии «РеалБест»!

 000 ЦИРМИ  INFO@CIRMI.RU  WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

9. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

9.3. 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.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

*По вопросам, касающимся качества набо-
ледует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест»
дресу:*

*17, г. Новосибирск-117, а/я 492,
(383) 332-92-49, 227-60-30;
/факс (383), 332-94-47, 332-94-44.
ail: plkobtk@vector-best.ru*

*Консультацию специалиста по работе с на-
м можно получить по тел.: (383) 334-35-90.*

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Международные сертификаты
ISO 9001 и ISO 13485

НАБОРЫ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИФА

Вирусные гепатиты А, В, С, D, Е, G, ТТ;
ГЧ-инфекция; ИППП; TORCH-инфекции;
герпесвирусные инфекции; беременность;
аутоиммунные, системные, паразитарные,
желудочно-кишечные заболевания;
гормоны; опухолевые и кардиомаркеры;
цитокины, аллергены и др.

***Точная диагностика –
эффективное лечение!***

Адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52

E-mail: vbmarket@vector-best.ru

Internet: www.vector-best.ru