

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления

ДНК *Klebsiella pneumoniae* и ДНК *Pseudomonas aeruginosa* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Klebsiella pneumoniae*/Pseudomonas aeruginosa»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК *Klebsiella pneumoniae* и ДНК *Pseudomonas aeruginosa* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Klebsiella pneumoniae*/Pseudomonas aeruginosa» предназначен для выявления ДНК *Klebsiella pneumoniae* и ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в клинических образцах, гемокультурах и бактериальных культурах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических образцов (плазма крови, соскобы со слизистой, моча, мокрота, аспират дыхательных путей, бронхоальвеолярный лаваж, раневое отделяемое, ликвор, биоптаты), объектов окружающей среды (смывы с поверхностей), гемокультур и бактериальных культур проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест экстракция 100» и «Лизирующий раствор», зарегистрированными в установленном порядке на территории РФ.

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: «CFX96», «iQ5 iCycler» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами, зарегистрированными в установленном порядке на территории РФ.

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

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-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридационного 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 ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

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:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Отрицательный контрольный образец (ОКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	2 флакона по 1 мл
Реакционная смесь для ПЦР (РС) <i>Лиофилизированная</i>	10 пробирок, каждая на 10 определений
Раствор для восстановления (РВ) <i>Бесцветная жидкость</i>	2 флакона по 2 мл

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Klebsiella pneumoniae* и ДНК *Pseudomonas aeru-*

ginosa определяется по четырём образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-741), с содержанием ДНК *Klebsiella pneumoniae* и ДНК *Pseudomonas aeruginosa* по 100 копий в пробе.

3.2. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Klebsiella pneumoniae*: клинические испытания, проведенные на 100 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Pseudomonas aeruginosa*: клинические испытания, проведенные на 100 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

3.3. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Klebsiella pneumoniae*: клинические испытания, проведенные на 100 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Pseudomonas aeruginosa*: клинические испытания, проведенные на 100 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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. ПКО и ОКО содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов

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

4.9. 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: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.10. 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»).

4.11. 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 (с каналами детекции «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange» и «FAM»/«Green»): «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия) или планшетного типа: «CFX96», «iQ5 iCycler» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналоги, зарегистрированные в установленном порядке на территории РФ;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);

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

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», 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);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, фирма «Corning Incorporated-Life Sciences», США);

- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «SSI», США);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (например, фирма «Corning Incorporated-Life Sciences», США).

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно 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 используется ДНК, выделенная из клинических образцов (плазма крови, соскобы со слизистой, моча, мокрота, аспират дыхательных путей, бронхоальвеолярный лаваж, раневое отделяемое, ликвор, биоптаты), объектов окружающей среды (смывы с поверхностей), гемокультур и бактериальных культур с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест экстракция 100» и «Лизирующий раствор» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и ОКО, которые являются компонентами данного набора.

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 (18-26) °С в течение 30 минут.

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 определений.

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

После первого вскрытия упаковки РС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.2.2. В пробирку с РС добавить 300 мкл РВ, аккуратно перемешать, выдержать

15 минут при температуре (18-26) °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

После вскрытия флакона РВ хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

Восстановленную РС использовать в день проведения анализа.

6.2.3. ПКО после вскрытия пробирки и ОКО после вскрытия флаконов хранить при температуре (2-8) °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 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

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

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

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 для всех приборов проводить при 60 °С.

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

«FAM» (для приборов «CFX96», «iQ5 iCycler», «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», «iQ5 iCycler»), «JOE» (для прибора «Rotor-Gene 3000»), «Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК *Klebsiella pneumoniae*;

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

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами и контрольными образцами 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 *Klebsiella pneumoniae* (канал «HEX»/«JOE»/«Yellow») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Pseudomonas aeruginosa* (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

Если для ПКО значение C_t по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» и/или по каналу «ROX»/«Orange» больше 32, необходимо повторное проведение анализа.

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» с C_t , меньшим или равным 36.

Если для ОКО значение C_t по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» и/или по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 36, то это свидетельствует о наличии контаминации (см.п. 8.2.6).

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. Для учёта результатов амплификации ДНК *Klebsiella pneumoniae*, определить Ct исследуемого образца по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» и провести анализ результата ПЦР в соответствии с критериями, приведенными в таблице.

8.2.3. Для учёта результатов амплификации ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, определить Ct исследуемого образца по каналу «ROX»/«Orange» и провести анализ результата ПЦР в соответствии с критериями, приведенными в таблице.

8.2.4. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца Ct по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow» и «ROX»/«Orange» больше 36 или не определяется.

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

8.2.5. Анализируемый образец считается положительным, (содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значения Ct по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow» и «ROX»/«Orange» меньше или равно 32.

Таблица

	Ct для исследуемого образца (Ct X)	Дополнительные критерии	Интерпретация результата	
1	Ct X > 36 или не определяется	-	Отрицательный результат	
2	Ct X ≤ 32	-	Положительный результат	
3	32 < Ct X ≤ 36	Ct OKO не определяется или (Ct OKO – Ct X) ≥ 4	Сомнительный результат (менее 10 ⁴ КОЕ/мл) *	
4		(Ct OKO – Ct X) < 4	OKO ≤ 36	см. п. 8.1.2
			OKO > 36	Отрицательный результат

*Если для образца получен сомнительный результат анализа (менее диагностически значимого количества) в этом случае проводится повторное проведение ПЦР-исследования данного образца начиная с этапа экстракции ДНК. В случае получения сомнительного результата повторно, требуется проведение исследования данного материала (для пациента) в динамике.

8.2.6. 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 26 °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 *Klebsiella pneumoniae/Pseudomonas aeruginosa*», 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
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

Сестер А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев В.К. Ткачев

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

Т.И. Поспелова





Пронумеровано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.
Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России



Захарова Л.Н.

20 июня 2019 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления
ДНК *Klebsiella pneumoniae* и ДНК *Pseudomonas aeruginosa* методом полимеразной
цепной реакции в режиме реального времени
«РеалБест ДНК *Klebsiella pneumoniae*/*Pseudomonas aeruginosa*»
(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК *Klebsiella pneumoniae* и ДНК *Pseudomonas aeruginosa* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Klebsiella pneumoniae*/*Pseudomonas aeruginosa*» предназначен для выявления ДНК *Klebsiella pneumoniae* и ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в клинических образцах, гемокультурах и бактериальных культурах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических образцов (плазма крови, соскобы со слизистой, моча, мокрота, аспират дыхательных путей, бронхоальвеолярный лаваж, раневое отделяемое, ликвор, биоптаты), объектов окружающей среды (смывы с поверхностей), гемокультур и бактериальных культур проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест экстракция 100» и «Лизирующий раствор», зарегистрированными в установленном порядке на территории РФ.

Комплект 1 применяется с регистрирующими амплификаторами: «CFX96», «iQ5 iCycler» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами, зарегистрированными в установленном порядке на территории РФ.

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 участ-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: Директором

по производству Ткачевым Р.К. и млч. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

ка 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 Таq ДНК -полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридационного 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 ДНК -полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителей инфекции из клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) Описание.	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Отрицательный контрольный образец (ОКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	2 флакона по 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) <i>Лиофилизированная</i>	96 пробирок
Оптическая пленка	1,5 листа

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Klebsiella pneumoniae* и ДНК *Pseudomonas aeruginosa* определяется по четырём образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-741), с содержанием ДНК *Klebsiella pneumoniae* и ДНК *Pseudomonas aeruginosa* по 100 копий в пробе.

3.2. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Klebsiella pneumoniae*: клинические испытания, проведенные на 100 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Pseudomonas aeruginosa*: клинические испытания, проведенные на 100 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

3.3. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Klebsiella pneumoniae*: клинические испытания, проведенные на 100 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Pseudomonas aeruginosa*: клинические испытания, проведенные на 100 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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. ПКО и ОКО содержат натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов

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

4.9. 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: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.10. 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»).

4.11. 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 (с каналами детекции «HEX», «ROX», «FAM»):

«CFX96», «iQ5 iCycler» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналоги, зарегистрированные в установленном порядке на территории РФ;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);

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

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», фирма «Eppendorf», Германия);

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

– мини-шейкер, обеспечивающий частоту вращения 1200 об/мин (например, «PSU-2T», фирма «BioSan», Латвия);

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

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, фирма «Corning Incorporated-Life Sciences», США);

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

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

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

– нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно 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 используется ДНК, выделенная из клинических образцов (плазма крови, соскобы со слизистой, моча, мокрота, аспират дыхательных путей, бронхоальвеолярный лаваж, раневое отделяемое, ликвор, биоптаты), объектов окружающей среды (смывы с поверхностей), гемокультур и бактериальных культур с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест экстракция 100» и «Лизирующий раствор» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и ОКО, которые являются компонентами данного набора.

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 (18-26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц 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! Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки и ОКО после вскрытия флаконов хранить при температуре (2-8) °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 для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200 об/мин в течение 1 минуты.

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):

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

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

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

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

«FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«HEX» – для регистрации сигнала ДНК *Klebsiella pneumoniae*;

«ROX» – для регистрации сигнала ДНК *Pseudomonas aeruginosa*.

7.6. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами и контрольными образцами, согласно инструкции к используемому прибору.

7.7. 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 C_t ВКО;

– нарастание сигнала амплификации ДНК *Klebsiella pneumoniae* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

– нарастание сигнала амплификации ДНК *Pseudomonas aeruginosa* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

Если для ПКО значение C_t по каналу «HEX» и/или по каналу «ROX» больше 32, необходимо повторное проведение анализа.

8.1.2. В 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 «HEX» и по каналу «ROX» с Ct, меньшим или равным 36.

Если для ОКО значение Ct по каналу «HEX» и/или по каналу «ROX» меньше или равно 36, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.6).

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. Для учёта результатов амплификации ДНК *Klebsiella pneumoniae*, определить Ct исследуемого образца по каналу «HEX» и провести анализ результата ПЦР в соответствии с критериями, приведенными в таблице.

8.2.3. Для учёта результатов амплификации ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, определить Ct исследуемого образца по каналу «ROX» и провести анализ результата ПЦР в соответствии с критериями, приведенными в таблице.

8.2.4. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекции), если для этого образца Ct по каналам «HEX» и «ROX» больше 36 или не определяется.

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

8.2.5. Анализируемый образец считается положительным, (содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значения Ct по каналам «HEX» и «ROX» меньше или равно 32.

Таблица

	Сt для исследуемого образца (Ct X)	Дополнительные критерии	Интерпретация результата	
1	$Ct\ X > 36$ или не определяется	-	Отрицательный результат	
2	$Ct\ X \leq 32$	-	Положительный результат	
3	$32 < Ct\ X \leq 36$	Ct ОКО не определяется или $(Ct\ ОКО - Ct\ X) \geq 4$	Сомнительный результат (менее 10^4 КОЕ/мл) *	
4		$(Ct\ ОКО - Ct\ X) < 4$	ОКО ≤ 36 ОКО > 36	см. п. 8.1.2 Отрицательный результат

*Если для образца получен сомнительный результат анализа (менее диагностически значимого количества) в этом случае проводится повторное проведение ПЦР-исследования данного образца начиная с этапа экстракции ДНК. В случае получения сомнительного результата повторно, требуется проведение исследования данного материала (для пациента) в динамике.

8.2.6. 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 26 °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 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 Klebsiella pneumoniae/Pseudomonas aeruginosa», 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
производства ПЦР-наборов
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

Т.И. Поспелова

М.П.





Продлано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н.
"20" июля 2019 г.

