

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«25» 2021 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для количественной оценки содержания ДНК человека в клинических образцах  
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

**«РеалБест Валидация образца»**

**(комплект 2)**

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест Валидация образца» предназначен для количественной оценки содержания ДНК человека в клинических образцах (*эпителиальных соскобах*) с целью валидации качества их забора и повышения достоверности результатов определения ДНК возбудителей инфекций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

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

Набор рекомендуется использовать одновременно с наборами серии «РеалБест» для определения ДНК возбудителей инфекций в эпителиальных соскобах.

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

### 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

#### 2.1. Принцип метода.

Принцип валидации качества забора образца основан на количественной оценке содержания участка ДНК гена гидроксиметилбилан синтетазы (HMBS) человека в ПЦР-пробе,

---

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

приготовленной из эпителиального соскоба с помощью наборов для выделения ДНК серии «РеалБест». Количество выявляемой в ПЦР-пробе ДНК человека пропорционально количеству эпителиальных клеток в соскобе. Отрицательный результат выявления ДНК возбудителя инфекции в соскобе является достоверным при содержании в ПЦР-пробе не менее 250 копий (геном-эквивалентов) ДНК гена HMBS, что свидетельствует о качественном заборе клинического материала для исследования.

## 2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок, каждая на 10 определений;

- раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона (по 2,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется пробирками 0,2 мл.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – определение 250 копий ДНК гена HMBS в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность определения ДНК гена HMBS (по стандартной панели предприятия отрицательных экстрактов) – 100%.

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (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 и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

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

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме ре-

ального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

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

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

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

## **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: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

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

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

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

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Финляндия);

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

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);

– пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма Axugen, США) или аналогичные;

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

## **6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью одного из наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-

экстракция 3», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100», согласно инструкции по применению соответствующего набора реагентов.

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

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

*Выделенную ДНК хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 2 суток.*

*Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия пробирки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 месяца.*

## **7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

### **7.1. Подготовка компонентов набора**

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

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

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

*Неиспользованную лиофилизированную РС хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.*

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

*После восстановления хранить реакционную смесь при температуре от 2 до 8 °С не более 2 недель.*

*Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 месяцев.*

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

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

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

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

7.4. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. Не захватывать осадок! Плотнo закрыть пробирки крышками.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК гена HMBS и ВКО, и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

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

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

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

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

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и гена HMBS человека.

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

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

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

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

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой «РеалБест диагностика» программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычис-

лениям результатов.

При использовании других амплификаторов учет результатов проводить в соответствии с разделом 9 данной инструкции.

## 9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 9.1. Общие условия учёта результатов.

#### 9.1.1. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК специфического продукта амплификации ДНК гена HMBS (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла  $C_t$  ПКО.

9.1.2. В отрицательном контрольном образце (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 «ROX»/«Orange».

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

9.1.4. Если для ОКО значение  $C_t$  по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 33, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В случае контаминации все результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки.

### 9.2. Оценка качества забора образца.

9.2.1. 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. Если для анализируемого образца значение  $C_t$  ВКО превышает значение  $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$  более чем на 2, то для корректной оценки качества забора материала необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.2.2. Если для анализируемого образца значение  $C_t$  ДНК гена HMBS по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 33 (*т.е. содержание ДНК гена HMBS в ПЦР-пробе не менее 250 копий*), то качество забора образца может быть признано удовлетворительным, а результат определения в ней ДНК возбудителей инфекций при помощи наборов серии «РеалБест» – достоверным.

9.2.3. Если для анализируемого образца значение  $C_t$  ДНК гена HMBS по каналу «ROX»/«Orange» больше 33 или не определяется, то необходимо провести повторный забор образца для исследования.

## 10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

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

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

## 11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест Валидация образца» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс (383) 252-51-81, 252-51-77.

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

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

Начальник отделения

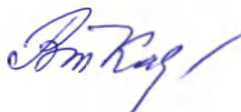
АО «Вектор-Бест»



А.В. Трухина

Директор по производству

АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Всего прошито, пронумеровано и  
скреплено печатью 7 листов.  
Директор по технологии и качеству  
АО "Вектор-Бест"

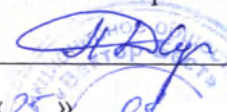
\_\_\_\_\_  
"20" \_\_\_\_\_ Масяго А.В.  
20 21 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов  
«25» 09 2021 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для количественной оценки содержания ДНК человека в клинических образцах  
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

**«РеалБест Валидация образца»**

(комплект 1)

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест Валидация образца» предназначен для количественной оценки содержания ДНК человека в клинических образцах (*эпителиальных соскобах*) с целью валидации качества их забора и повышения достоверности результатов определения ДНК возбудителей инфекций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

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

Набор рекомендуется использовать одновременно с наборами серии «РеалБест» для определения ДНК возбудителей инфекций в эпителиальных соскобах.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

### 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

#### 2.1. Принцип метода.

Принцип валидации качества забора образца основан на количественной оценке содержания участка ДНК гена гидроксиметилбилан синтетазы (HMBS) человека в ПЦР-пробе, приготовленной из эпителиального соскоба с помощью наборов для выделения ДНК серии

---

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

**«РеалБест».** Количество выявляемой в ПЦР-пробе ДНК человека пропорционально количеству эпителиальных клеток в соскобе. Отрицательный результат выявления ДНК возбудителя инфекции в соскобе является достоверным при содержании в ПЦР-пробе не менее 250 копий (*геном-эквивалентов*) ДНК гена HMBS, что свидетельствует о качественном заборе клинического материала для исследования.

## 2.2. Состав набора:

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

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1,5 листа.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – определение 250 копий ДНК гена HMBS в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность определения ДНК гена HMBS (по стандартной панели предприятия отрицательных экстрактов) – 100%.

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс I (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 и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

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

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

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

пипеток.

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

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

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

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

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

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

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Финляндия);

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

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);

– пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма Ахуген, США) или аналогичные;

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

– нож канцелярский.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического ма-

териала с помощью одного из наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100», согласно инструкции по применению соответствующего набора реагентов.

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

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

*Выделенную ДНК хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 2 суток.*

*Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия пробирки хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес.*

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. Подготовка компонентов набора

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

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

*После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.*

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с готовой реакционной смесью для ПЦР (ГРС) пронумеровать и расположить в штативе.

**Внимание!** Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.3. В каждую пробирку дозатором с отдельным наконечником с фильтром внести 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Не захватывать осадок! Заклеить оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК гена HMBS и ВКО, и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

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

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и гена HMBS человека.

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

Для регистрации процесса амплификации ДНК гена HMBS следует выбрать канал детекции «ROX».

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

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

## **8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой «РеалБест диагностика» программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов учет результатов проводить в соответствии с разделом 9 данной инструкции.

## **9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ**

9.1. Общие условия учёта результатов.

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

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК специфического продукта амплификации ДНК гена HMBS (канал «ROX») и определять значение порогового цикла  $C_t$  ПКО.

9.1.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять  $C_t$  ВКО, при этом

программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

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

9.1.4. Если для ОКО значение  $C_t$  по каналу «ROX» меньше или равно 33, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В случае контаминации все результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки.

9.2. Оценка качества забора образца.

9.2.1. 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. Если для анализируемого образца значение  $C_t$  ВКО превышает значение  $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$  более чем на 2, то для корректной оценки качества забора материала необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.2.2. Если для анализируемого образца значение  $C_t$  ДНК гена HMBS по каналу «ROX» меньше или равно 33 (*т.е. содержание ДНК гена HMBS в ПЦР-пробе не менее 250 копий*), то качество забора образца может быть признано удовлетворительным, а результат определения в ней ДНК возбудителей инфекций при помощи наборов серии «РеалБест» – достоверным.

9.2.3. Если для анализируемого образца значение  $C_t$  ДНК гена HMBS по каналу «ROX» больше 33 или не определяется, то необходимо провести повторный забор образца для исследования.

## 10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

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

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

## 11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест Валидация образца» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс (383) 252-51-81, 252-51-77.

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

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

Начальник отделения

АО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству

АО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Всего прошито, пронумеровано и  
скреплено печатью 7 листов.

Директор по технологии и качеству  
АО "Вектор-Бест"



\_\_\_\_\_ Масяго А.В.

\_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.