

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2022 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Ureaplasma urealyticum* методом  
полимеразной цепной реакции в режиме реального времени  
**«РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*/Ureaplasma urealyticum»**  
(комплект 1)

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Ureaplasma urealyticum* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*/Ureaplasma urealyticum» предназначен для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Ureaplasma urealyticum* 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 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100».

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

#### Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1,5 листа.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия, СОП ДНК *Chlamydia trachomatis* (СОП 05-2-288), с содержанием ДНК *Chlamydia trachomatis* 100 копий в пробе – 100%.

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%.

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

Специфичность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Chlamydia trachomatis* (СОП 05-2-288), с содержанием ДНК *Chlamydia trachomatis* 100 копий в пробе – 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*: клини-



ческие испытания, проведенные на 55 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 94,7%-100%, с доверительной вероятностью 90%);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum*: клинические испытания, проведенные на 63 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 95,4%-100%, с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*: клинические испытания, проведенные на 133 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 97,8% - 100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum*: клинические испытания, проведенные на 125 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 97,6%-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 26 (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, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». 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:

«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 «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»);

– нож канцелярский.

## **6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ**

### **6.1. Подготовка анализируемых образцов.**

Материалом для определения ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Ureaplasma urealyticum* 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 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 °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.

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

«FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«HEX» – для регистрации сигнала ДНК *Chlamydia trachomatis*;

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

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролем 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 *Chlamydia trachomatis* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Ureaplasma urealyticum* (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  $C_t$  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  $C_t$  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» и «ROX» 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 *Chlamydia trachomatis*, если для этого образца значение  $C_t$  по каналу «HEX» меньше или равно 40.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Ureaplasma urealyticum*, если для этого образца значение  $C_t$  по каналу «ROX» 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 Chlamydia trachomatis/Ureaplasma urealyticum», 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;

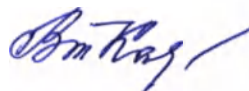
E-mail: [plkobtk@vector-best.ru](mailto:plkobtk@vector-best.ru)

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 8 листов.  
Директор по технологии и качеству  
АО «Вектор-Бест»

\_\_\_\_\_  
“ 10.04 ” 20 22 г. Масяго А.В.



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«Вектор-Бест» 04 2022 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Ureaplasma urealyticum* методом

полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

**«РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*/Ureaplasma urealyticum»**

(комплект 2)

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Ureaplasma urealyticum* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*/Ureaplasma urealyticum» предназначен для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Ureaplasma urealyticum* 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 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100».

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия), так и планшетного типа: «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 денату-

---

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

рация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Таq-полимеразой. В основе регистрации 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;
- 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 *Chlamydia trachomatis* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия, СОП ДНК *Chlamydia trachomatis* (СОП 05-2-288), с содержанием ДНК *Chlamydia trachomatis* 100 копий в пробе – 100%.

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%.

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

Специфичность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК *Chlamydia trachomatis* (СОП 05-2-288), с содержанием



ДНК *Chlamydia trachomatis* 100 копий в пробе – 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*: клинические испытания, проведенные на 55 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 94,7%-100%, с доверительной вероятностью 90%);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum*: клинические испытания, проведенные на 63 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 95,4%-100%, с доверительной вероятностью 90%);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis*: клинические испытания, проведенные на 133 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 97,8% - 100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum*: клинические испытания, проведенные на 125 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 97,6%-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 26 (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-

лирующими 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, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий». 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: «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 *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Ureaplasma urealyticum* 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 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 «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 «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 «CFX96», «ДТ-96»), «JOE» (для прибора «Rotor-Gene 3000»), «Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК *Chlamydia trachomatis*;

«ROX» (для приборов «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов

«Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК *Ureaplasma urealyticum*.

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. 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 *Chlamydia trachomatis* (канал «HEX»/«JOE»/«Yellow») и определять значение порогового цикла  $C_t$  ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Ureaplasma urealyticum* (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 значение  $C_t$  по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow» и «ROX»/«Orange» больше 40 или не определяется.

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

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

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Ureaplasma urealyticum*, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» 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 Chlamydia trachomatis/Ureaplasma urealyticum», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

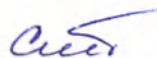
630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

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)

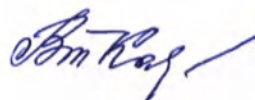
Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

Начальник отделения  
АО «Вектор-Бест»



А.В. Трухина

Директор по производству  
АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев



Всего прошито, пронумеровано и  
скреплено печатью 9 листов.  
Директор по технологии и качеству  
АО «Вектор-Бест»



Масяго А.В.  
20 22 г.