

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

«15» сентября 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для дифференциального выявления
ДНК *Aspergillus fumigatus* и ДНК *Aspergillus flavus* методом полимеразной цепной
реакции в режиме реального времени
«РеалБест ДНК *Aspergillus fumigatus*/*Aspergillus flavus*»

ВВЕДЕНИЕ

Aspergillus spp. – это род высших плесневых грибов, отдельные виды которого могут приводить к развитию ряда серьёзных патологий человека, называемых аспергиллёзами.

Аспергиллы – повсеместно распространённые сапрофиты, обнаруживаемые в почве, воздухе, пыли, на растениях, коже человека и животных, в пищевых продуктах. Наиболее частый механизм инфицирования – аэрогенный, реже возможны травматическая имплантация возбудителя, алиментарный путь заражения. Описаны внутрибольничные вспышки при проведении ремонтных работ, контаминации систем вентиляции, водоснабжения и медицинских инструментов.

Патогенность аспергилл обусловлена их способностью к инвазивному росту, синтезу разнообразных ферментов класса гидролаз (особенно, кератиназы и эластазы), выделению экзотоксинов и наличием аллергенов, количество которых отличается в зависимости от вида.

Патогенные виды *Aspergillus* могут поражать различные органы и ткани, чаще всего первичные очаги инфекции развиваются в лёгких и носовых пазухах. Конидии могут обнаруживаться на многих открытых поверхностях тела человека, однако, в случае иммунокомпетентности их прорастание контролируется макрофагами. Таким образом, формируется «здоровое носительство», т.е. колонизация слизистых или кожи аспергиллами. Первичные аспергиллёзы менее характерны, могут поражать кожу, ногти, волосы и зачастую развиваются при прямой имплантации возбудителя после травмы, в т.ч.

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

ятрогенной природы. В основе патогенеза инвазивных форм аспергиллёзов лежат значимые нарушения иммунного ответа (первичные и вторичные иммунодефициты, лекарственная иммуносупрессия и пр.). Лёгочные формы часто выступают осложнением сопутствующих заболеваний (туберкулез, хроническая обструктивная болезнь легких, пневмония, в т.ч. COVID-ассоциированная). Поражения могут быть локально инвазивными или приводить к деструкции, в ряде случаев возможна гематогенная диссеминация аспергилл с поражением головного мозга, кожи, печени, почек и пр. Клинические признаки инвазивных аспергиллёзов неспецифичны, поэтому зачастую их диагностируют поздно, в т.ч. и посмертно. Летальность зависит от адекватности лечения, распространённости или локализации аспергиллёза, тяжести сопутствующих патологий и выраженности иммуносупрессии. Именно поэтому так важна ранняя диагностика, которая у пациентов с факторами риска должна быть проведена в течение 24 часов.

Ввиду особенностей возбудителя и развития инфекционного процесса диагностика аспергиллёза представляет собой трудную задачу, требующую комплексного подхода. «Золотым стандартом» диагностики считается культуральный метод в сочетании с дополнительными методами исследования – компьютерная томография, рентгенография лёгких и бронхоскопия (в случае лёгочных форм), микроскопия мазков и гистологическое исследование материала из очагов поражения, а также серологические методы (определение галактоманнана в различных субстратах). Большинство этих методов достаточно трудоёмко, а также обладает недостаточно высокой чувствительностью и/или специфичностью.

Использование метода ПЦР в диагностике аспергиллёзов имеет ряд преимуществ, таких как высокая специфичность, доступность и высокая скорость получения результата исследования. Однако, для снижения вероятности получения недостоверного результата следует учитывать высокие требования к качеству образцов биоматериала и адекватной интерпретации полученных результатов. Так, причины ложноотрицательных результатов могут быть связаны с игнорированием правил преаналитического этапа (взятие биоматериала на фоне проводимой антифунгальной/антибактериальной терапии или взятие образцов с участков, не поражённых аспергиллами). Для снижения риска гипердиагностики необходима адекватная интерпретация результата ПЦР, полученного при исследовании нестерильных сред. Широкая распространённость аспергилл в окружающей среде, а также взятие образцов с интактных поверхностей, особенно при отсутствии факторов риска аспергиллёзов, может приводить к получению ложноположительных результатов, отражающих «здоровое носительство». Положительные результаты ПЦР-исследования

стерильных сред (биоптаты, кровь, ликвор) более однозначны и могут свидетельствовать о развитии инвазивной инфекции. Однако, вне зависимости от вида биоматериала рекомендуется комплексный подход с учётом факторов риска, клинических признаков и данных других диагностических методов.

В настоящий момент род *Aspergillus* насчитывает несколько сотен видов, из них порядка 20 считаются патогенными. Наиболее частыми возбудителями аспергиллёзов являются *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* и *A. terreus*.

A. fumigatus считается главной причиной всех форм аспергиллёза. Данный вид может быть как основным, так и оппортунистическим возбудителем. *A. fumigatus* продуцирует митотоксин фумигоклавин, обладающий гемолитическим и антигенным действием и способен приводить к тяжёлым интоксикациям. Наличие 19 аллергенов позволяет этому виду выступать в качестве значимого этиологического фактора микотических сенсibilизаций. Наиболее часто *A. fumigatus* приводит к развитию инвазивных лёгочных поражений и аллергических состояний (например, аллергический бронхолёгочный аспергиллёз).

A. flavus занимает второе место по встречаемости, зачастую инфицируя придаточные пазухи носа и колонизируя открытые полости тела человека. Данный вид продуцирует смертельно опасные афлатоксины – сильные гепатоканцерогены. *A. flavus* чаще всего вызывает инвазивные внелегочные формы, вероятно, потому что имеет тенденцию поражать пациентов с более ослабленным иммунитетом, чем *A. fumigatus*.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК *Aspergillus fumigatus* и ДНК *Aspergillus flavus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Aspergillus fumigatus*/*Aspergillus flavus*» предназначен для качественного выявления ДНК *Aspergillus fumigatus* и ДНК *Aspergillus flavus*, выделенной из клинических образцов (соскоб с пораженного участка кожи или слизистой, раневое отделяемое, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), биоптаты/аутоптаты) и культур возбудителей микозов (культур, высеваемых с инфекционного материала от больных (отделяемое дренажей, промывные воды, пунктаты и пр.)) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени в качестве вспомогательного средства диагностики. Набор может быть использован для диагностики местных и системных форм аспергиллеза, дифференциальной диагностики грибковых инфекций. Набор не имеет популяционных и демографических аспектов

применения.

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 целевых генов, 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 клинических проб 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>	2 пробирки по 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) <i>Лиофилизированная</i>	96 пробирок
Оптическая пленка	1,5 листа
Вкладыш со штрих-кодом	1 шт.

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- инструкция по применению и паспорт (количество копий определяется в договоре на поставку продукции).

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из клинических образцов (соскобы с пораженного участка кожи или слизистой), культур возбудителей микозов с использованием наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «Лизирующий раствор», «РеалБест Сорбитус», «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест УниМаг» производства АО «Вектор-Бест», из клинических образцов мокроты, бронхоальвеолярного лаважа с использованием наборов «РеалБест Сорбитус», «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест УниМаг», биоптатов/аутоптатов с использованием наборов «РеалБест УниМаг» и «РеалБест экстракция 100», из раневого отделяемого с использованием набора «РеалБест экстракция 100».

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа с термоблоком для пробирок объемом 0,2 мл и каналами детекции «ROX», «FAM», «HEX». В ходе клинических испытаний валидированы следующие амплификаторы: «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США, РУ № ФСЗ 2008/03399), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229), «FLUORITE» (Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай, РУ № РЗН 2022/1641).

Запуск программы амплификации и анализ результатов может производиться с помощью программного обеспечения «GP.РеалБест Диагностика» (размещена на сайте <http://www.vector-best.ru>).

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

Показания к применению. Набор может быть использован для диагностики местных и системных форм аспергиллеза, дифференциальной диагностики грибковых инфекций.

Противопоказания. Не применимо. Изделие предназначено для клинической лабораторной диагностики.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность.

За аналитическую чувствительность принята величина концентрации целевой ДНК, для которой при экспериментальной проверке на двух сериях набора на 90 повторях для каждой серии с использованием амплификаторов «CFX96», «ДТпрайм», «FLUORITE» и наборов для выделения НК «РеалБест ДНК-экспресс», «Лизирующий раствор», «РеалБест Сорбитус», «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест УниМаг» был получен положительный

результат в 100% случаев.

Набор гарантированно выявляет ДНК *Aspergillus fumigatus* и ДНК *Aspergillus flavus* в концентрации 100 копий в ПЦР-пробе (соответствует $1,2 \times 10^4$ копий/мл исходного образца при выделении ДНК с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «Лизирующий раствор» и 4×10^3 копий/мл исходного образца при выделении ДНК с помощью наборов «РеалБест Сорбитус», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг»).

3.2. Аналитическая специфичность.

Был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базам последовательностей микроорганизмов, которые могут присутствовать в клинических образцах (*Candida spp*, *Trichophyton spp*, *Epidermophyton spp*, *Cryptococcus spp*, *Penicillium spp*, *Microsporum spp*, *Histoplasma spp*, *Malassezia spp*, *Phialophora spp*, *Blastomyces spp*, *Coccidioides spp*, другие виды *Aspergillus spp*). Возможность перекрестных реакций исключена.

Аналитическая специфичность выявления ДНК *Aspergillus fumigatus* и ДНК *Aspergillus flavus* была подтверждена отсутствием перекрестных ложноположительных сигналов при анализе образцов, содержащих ДНК микроорганизмов, которые могут встретиться в биоматериале: *Alternaria alternate*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Candida albicans*, *Candida auris*, *Candida castellii*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida maltosa*, *Candida norvegica*, *Candida parapsilosis*, *Candida rhagii*, *Candida saitoana*, *Candida tropicalis*, *Candida viswanathii*, *Clavispora lusitaniae*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus magnus*, *Epidermophyton floccosum*, *Fusarium verticillioides*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum fragrans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Microsporum canis*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia fermentans*, *Priceomyces carsonii*, *Pseudallescheria boydii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Scopulariopsis asperula*, *Trichoderma album*, *Trichophyton gypseum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichosporon cutaneum*, *Wickerhamomyces anomalus*, в концентрациях 10^6 - 10^7 копий/мл. Перекрестно реагирующих ДНК по данным, полученным при исследованиях в рамках клинико-лабораторных испытаний, обнаружено не было.

3.3. Диагностическая чувствительность:

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Aspergillus fumigatus*: клинические испытания, проведенные на 60 положительных образцах, содержащих ДНК *Aspergillus fumigatus*, показали 100 % чувствительность (интервал 93,98 – 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК *Aspergillus flavus*: клинические испытания, проведенные на 59 положительных образцах, содержащих ДНК *Aspergillus flavus*, показали 100 % чувствительность (интервал 93,88 – 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.4. Диагностическая специфичность:

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Aspergillus fumigatus*: клинические испытания, проведенные на 135 отрицательных образцах, не содержащих ДНК *Aspergillus fumigatus*, показали 100 % специфичность (интервал 97,23 - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

- диагностическая специфичность выявления ДНК *Aspergillus flavus*: клинические испытания, проведенные на 136 отрицательных образцах, не содержащих ДНК *Aspergillus flavus*, показали 100 % специфичность (интервал 97,25 - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

В инструкции приведены данные об оценке диагностических чувствительности и специфичности, полученные в ходе клинических испытаний данного набора.

3.5. Повторяемость и воспроизводимость результатов.

При тестировании на одной серии набора, на одном оборудовании, одним оператором, в одной лаборатории 2 образцов в 8 повторах каждый повторяемость составила 100%, коэффициент вариации C_t не более 3%.

При тестировании в шести независимых постановках тремя разными операторами на двух сериях набора в двух лабораториях 2 образцов в 8 повторах каждый внутрисерийная, межпостановочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость, межлабораторная воспроизводимость результатов составила 100 %. Коэффициент вариации C_t не более 4 %.

3.6. Потенциально-интерферирующие вещества.

Интерферирующие вещества исследовали на модельных образцах клинического материала путем внесения известных количеств интерферентов. Показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ в образцах соскобов с пораженного участка слизистой (кровь и муцин до 0,5%), раневом отделяемом (кровь до 50%), мокроте (кровь и муцин до 0,5%), бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) (кровь и муцин до 0,5%) на результаты анализа.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ от

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению ДНК *Aspergillus fumigatus* и ДНК *Aspergillus flavus*, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики (например, врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), иной специалист).

4.3. ПКО содержит 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 необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием.

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

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% 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, 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»

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени планшетного типа с термоблоком для пробирок объемом 0,2 мл и каналами детекции «FAM», «HEX», «ROX»: «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США, РУ № ФСЗ 2008/03399), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2011/10229) или «FLUORITE» (Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай, РУ № РЗН 2022/1641);
- ПЦР-бокс (например, «Бокс абактериальной воздушной среды для защиты оператора при работе с патогенными агентами и микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем БАВп-01-“Ламинар-С” по ТУ 9443-003-51495026-2004», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, РУ № ФСР 2010/07111);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, «Дозаторы механические одноканальные BIONIT», Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Финляндия, РУ № ФС 2012/12201);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, «Наконечники для пипеточных дозаторов Sartorius, стерильные, с фильтром» Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Финляндия, РУ № РЗН 2020/9707);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», Ansell HealthCare, Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 мл (например, «Штативы для хранения и транспортировки пробирок», Scientific Specialties Incorporated (SSI), США, РУ № ФСЗ 2011/10287);
- контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора, хранения, транспортирования и утилизации колюще-режущих отходов», ООО «КМ-ПРОЕКТ», Россия, РУ № РЗН 2017/5395 от 01.02.2021);
- нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории, включая процесс выделения НК из них, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Для анализа используется ДНК, выделенная из клинических образцов согласно инструкциям по применению соответствующих наборов серии «РеалБест». Наборы, подходящие для каждого вида клинических образцов, указаны в таблице:

Тип образца	Набор для выделения НК			
	«РеалБест ДНК-экспресс», «Лизирующий раствор»	«РеалБест Сорбитус»	«РеалБест экстракция 100»	«РеалБест УниМаг»
Соскоб с пораженного участка кожи или слизистой	+	+	+	+
Раневое отделяемое	–	–	+	–
Мокрота	–	+	+	+
Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)	–	+	+	+
Биоптаты/аутоптаты	–	–	+	+
Культуры возбудителей микозов	+	+	+	+

Образцы соскобов с пораженного участка кожи или слизистой и раневого отделяемого, забранные с помощью одноразовых стерильных зондов в пробирки с «Транспортным раствором» (АО «Вектор-Бест», Россия, РУ № РЗН 2017/6004 от 24.07.2017), тщательно перемешать. 100 мкл полученной суспензии использовать для выделения ДНК.

Для образцов мокроты необходимо предварительно провести процедуру подготовки к выделению нуклеиновых кислот. К образцу биоматериала добавить равный объем 95% этилового спирта, тщательно перемешать, выдержать при температуре (18–26) °С 10 минут. Еще раз тщательно перемешать. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения ДНК. Не захватывать комки слизи!

Образцы БАЛ должны быть предварительно обработаны: отобрать 1 мл биоматериала в отдельную пробирку и центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 10 минут. Затем отобрать и удалить 0,8 мл надосадочной жидкости, осадок ресуспендировать

в оставшейся жидкости. Если образец содержит слизь, провести процедуру обработки, как описано для образцов мокроты. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения ДНК.

Образцы биоптатов/аутоптатов предварительно гомогенизировать при помощи лабораторного гомогенизатора согласно соответствующей инструкции по применению. 100 мкл полученной суспензии использовать для выделения ДНК.

Образцы культур возбудителей микозов, забранные в пробирки с «Транспортным раствором» производства АО «Вектор-Бест», тщательно перемешать, 100 мкл полученной суспензии использовать для выделения ДНК.

Транспортировать и хранить образцы:

- соскобов с пораженного участка кожи или слизистой, раневого отделяемого, мокроты, культур возбудителей микозов

при температуре (18–26) °С не более 6 часов;

при температуре (2–8) °С не более 3 суток;

при температуре минус (18–40) °С не более 2 недель;

при температуре ниже минус 40°С – длительно.

- БАЛ, биоптатов/аутоптатов

при температуре (18–26) °С не более 2 часов;

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

при температуре минус (18–40) °С не более 2 недель;

при температуре ниже минус 40°С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО, который является компонентом данного набора, 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 (18–26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество пробирок с ГРС по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы (1 ОКО и 1 ПКО). 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 хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество пробирок с ГРС по числу подготовленных образцов, включая контрольные образцы, пронумеровать (если необходимо) и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Аккуратно удалить пленку, закрывающую пробирки.

Внимание! При удалении пленки следите, чтобы вместе с ней не была удалена ГРС.

В каждую пробирку с ГРС дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

7.3. Заклеить пробирки оптической пленкой.

Внимание! Нельзя наносить на оптическую пленку какие-либо надписи. Оптическая пленка должна оставаться чистой!

Для повышения эффективности и скорости смешивания компонентов рекомендуется перемешать содержимое пробирок в мини-шейкере с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК *Aspergillus fumigatus*, ДНК *Aspergillus flavus* и детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

Протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

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

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК.

«FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«HEX» – для регистрации процесса амплификации ДНК *Aspergillus fumigatus*;

«ROX» – для регистрации процесса амплификации ДНК *Aspergillus flavus*.

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

7.8. Запустить амплификатор для выполнения заданного протокола.

При использовании программы «GP.РеалБест Диагностика»:

7.9. Запустить программное обеспечение «GP.РеалБест Диагностика».

7.10. Со вкладыша с информацией ввести данные штрих-кодов набора.

7.11. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами.

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

8. АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учета 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 *Aspergillus fumigatus* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Aspergillus flavus* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

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 нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам, «HEX» и «ROX» с C_t , меньшим или равным 35.

Если для ОКО значение C_t по каналам «HEX» и/или «ROX» меньше или равно 35, 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

Aspergillus fumigatus, если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» больше 35 или не определяется.

Анализируемый образец считается отрицательным, не содержащим ДНК *Aspergillus flavus*, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 35 или не определяется.

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

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Aspergillus fumigatus*, если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» меньше или равно 35.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Aspergillus flavus*, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 35.

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 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 – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

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.

Инструкция по применению и паспорт размещены на сайте <http://www.vector-best.ru>.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК *Aspergillus fumigatus/Aspergillus flavus*», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

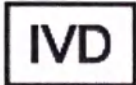
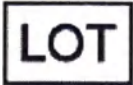
630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

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

E-mail: plkobik@vector-best.ru

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

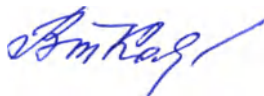
ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

Символ	Описание	Символ	Описание
	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Содержимого достаточно для проведения n-тестов		Предел температуры
	Код партии		Дата изготовления
	Изготовитель		Обратитесь к инструкции по применению
	Использовать до....	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

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



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 16 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

15 09 2015 г. Захарова Л.Н.