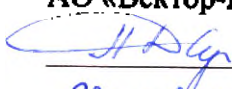


«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«28» августа 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae*

методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Mycoplasma pneumoniae*»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Mycoplasma pneumoniae*» предназначен для выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100».

Набор реагентов предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

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

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 регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле

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

ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридизационного 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 клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

Таблица

Компонент набора (сокращение) Описание	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) <i>Прозрачная бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1,0 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) <i>Лиофилизированная. Аморфная масса белого цвета</i>	96 пробирок
Оптическая пленка	1,5 листа
Вкладыш со штрих-кодом	1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae* определяется по стандартной панели отрицательных образцов ДНК-экстрактов, СПП (СПП 05-2-561), как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные, и составляет 100%.

3.2. Чувствительность определяется по пяти образцам с содержанием ДНК бактерий *Mycoplasma pneumoniae* 100 копий в пробе, приготовленным из СОП ДНК бактерий *Mycoplasma pneumoniae* (СОП 05-2-544), как процентное содержание образцов, определенных набором как положительные, и составляет 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae*: клинические испытания, проведенные на 46 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 93,7 %-100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Mycoplasma pneumoniae*: клиниче-

ские испытания, проведенные на 46 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 93,7 %-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. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению НК возбудителей острых кишечных инфекций, 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.

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 НК и постановки ПЦР/ОТ-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. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

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. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить 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 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 («ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- дозаторы полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (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 (фирма «FinnTip», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный);
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

Для образцов, содержащих слизь, 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. Ещё раз тщательно перемешать. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения нуклеиновых кислот. Не захватывать комки слизи!

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содер-

жать положительный контрольный образец (ПКО) 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 (18-25) °С.

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

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре от минус 18 до минус 60 °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с готовой реакционной смесью для ПЦР (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 контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый 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.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с 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 по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

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

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 мин;

2 стадия: 95 °С – 2 мин;

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

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК

Mycoplasma pneumoniae:

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

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* 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

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

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma pneumoniae* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла Ct *Mycoplasma pneumoniae*.

8.2. В отрицательном контрольном образце (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 «ROX».

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

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Вычислить $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(Ct \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.2. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.3. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

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

9.4. Если для ОКО значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в 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, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2-8) °С всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание не допускается.

10.2. 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. Замораживание не допускается.

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

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

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

11.3. 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.

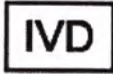
По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК *Mycoplasma pneumoniae*», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

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

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

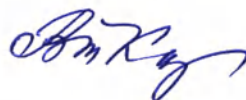
Символ	Описание	Символ	Описание
	Номер по каталогу		Осторожно!
	Содержимого достаточно для проведения n тестов		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Код партии		Предел температуры
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до		Обратитесь к инструкции по применению
YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата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

Начальник отделения
производства ПЦР наборов
АО «Вектор-Бест»



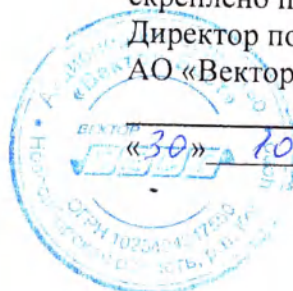
А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.
Директор по технологии и качеству
АО «Вектор-Бест»



Масяго «30»-10 2023 г. Масяго А.В.