

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБУ «ГНЦДК»

Минздрава России, академик РАН

А. А. Кубанов

«20» мая 2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для проведения лабораторных диагностических исследований *in vitro* с целью качественного определения ДНК *Mycobacterium leprae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

«*M. leprae* ПЦР РВ»

по ТУ 21.20.23-001-86582224-2023

Оглавление

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ | 4 |
| 2. | ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА | 4 |
| 2.1. | Основные потребительские характеристики | 4 |
| 2.2. | Состав и комплектация набора | 5 |
| 2.3. | Принцип определения | 6 |
| 3. | КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА | 6 |
| 4. | ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ | 7 |
| 5. | МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ | 8 |
| 6. | ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ | 10 |
| 7. | ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ | 13 |
| 7.1. | Биоптаты кожи | 13 |
| 7.2. | Соскобы с кожных покровов и мазки со слизистой оболочки носа | 14 |
| 8. | ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА | 14 |
| 8.1. | Предел обнаружения | 14 |
| 8.2. | Прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости | 15 |
| 8.3. | Аналитическая специфичность | 15 |
| 8.4. | Диагностические характеристики: | 16 |
| 8.5. | Клиническая эффективность | 16 |
| 9. | ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ | 19 |
| 10. | СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ | 20 |
| 10.1. | Подготовка реагентов и материалов | 20 |
| 10.2. | Проведение исследований | 20 |
| 10.3. | Экстракция ДНК из исследуемого материала | 20 |
| 10.4. | Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) | 20 |
| 10.5. | Анализ результатов | 22 |
| 10.6. | Интерпретация результатов | 22 |
| 10.7. | Критерии валидности для контрольных образцов | 22 |
| 11. | ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ И ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕМОНТ | 23 |
| 12. | СРОК ГОДНОСТИ | 23 |
| 13. | ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ | 23 |
| 14. | УСЛОВИЯ ОТПУСКА | 24 |
| 15. | ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ | 24 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|--------|--|
| ДНК | дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ПЦР | полимеразная цепная реакция |
| ПЦР РВ | полимеразная цепная реакция в режиме реального времени |
| Ct | Cycle threshold (пороговый цикл) |
| S | анализируемый образец |
| ВКО | внутренний контрольный образец |
| ПКО | положительный контроль |
| ОКО | отрицательный контроль экстракции |
| К- | отрицательный контроль амплификации |

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для проведения лабораторных диагностических исследований *in vitro* с целью качественного определения ДНК *Mycobacterium leprae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «*M. leprae* ПЦР РВ» по ТУ 21.20.23-001-86582224-2023.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: набор реагентов «*M. leprae* ПЦР РВ» или краткое сокращение «набор реагентов» и «набор».

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Основные положения: Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные путём экстракции ДНК из биоптатов, соскобов с кожных покровов и мазков со слизистой оболочки носа.

Набор реагентов одноразового использования предназначен для дробного проведения ПЦР-исследований 96 проб, включая контрольные образцы.

Назначение: Набор реагентов «*M. leprae* ПЦР РВ» предназначен для проведения лабораторных диагностических исследований *in vitro* с целью качественного определения ДНК *Mycobacterium leprae* в биологическом материале человека (биоптат, соскобы с кожных покровов и мазки со слизистой оболочки носа) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени. Анализ предназначен для обнаружения ДНК бактерии *Mycobacterium leprae*, вызывающей инфекционное заболевание Лепру (болезнь Гансена).

Область применения: лабораторная диагностика (код области: 0300200).

Показания к применению: используется при проведении обследования лиц с кожной симптоматикой, соответствующей клиническим проявлениям лепры; для дифференциальной диагностики; обследование мигрантов и лиц без гражданства. Популяционные или демографические аспекты не влияют на применение медицинского изделия для диагностики *in vitro* по назначению, установленному производителем.

Потенциальные потребители: для профессионального использования квалифицированным медицинским персоналом клиничко-диагностических лабораторий и медицинских учреждений, изучившим инструкцию по применению – врач-специалист (врач клинической лабораторной диагностики), медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), медицинский технолог (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 6 августа 2007 г. № 526 «Об утверждении профессиональных квалификационных групп должностей медицинских и фармацевтических работников»).

Побочные действия: в рамках установленных производителем значений не выявлены.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Основные потребительские характеристики

Набор реагентов одноразового использования предназначен для дробного проведения ПЦР-исследований 96 проб, включая контрольные образцы.

Набор реагентов не содержит материалов и веществ животного и (или) человеческого происхождения, включая сыворотку (плазму) крови человека или других элементов ткани человека, инфекционных агентов, а также лекарственных средств, не содержит мутагенных и канцерогенных компонентов.

Набор реагентов не является стерильным медицинским изделием.

Набор реагентов не является средством измерения медицинского назначения.

Потенциальные потребители: для профессионального использования квалифицированным медицинским персоналом клиничко-диагностических лабораторий и медицинских учреждений, изучившим инструкцию по применению – врач-специалист (врач клинической лабораторной диагностики), медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), медицинский технолог (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 6 августа 2007 г. № 526 «Об утверждении профессиональных квалификационных групп должностей медицинских и фармацевтических работников»).

2.2. Состав и комплектация набора

Таблица 1

Состав набора

| Компонент | Описание состава набора реагентов | Объём, мл | Количество, шт |
|--------------------------|--|-----------|----------------|
| ПЦР-смесь-ML | Буферный раствор с праймерами и ДНК-зондом, специфическими к последовательности RLEP <i>Mycobacterium leprae</i> , а также к фрагменту искусственно синтезированной последовательности. Прозрачная или слегка опалесцирующая светло-голубая жидкость | 0,1 мл | 1 пробирка |
| ПЦР-буфер-ML | Буферный раствор, содержащий ионы двухвалентного магния и термостабильную ДНК-полимеразу, а также дНТФ, готовый к использованию раствор. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость | 0,55 | 1 пробирка |
| ПКО-ML | Положительный контрольный образец, содержащий искусственно синтезированную последовательность ДНК, соответствующую участку гибридизации праймеров и зонда повторяющегося элемента RLEP генома <i>Mycobacterium leprae</i> . Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость | 0,26 | 1 пробирка |
| ВКО-ML | Внутренний контрольный образец, контроль этапа экстракции, содержащий очищенную воду и раствор искусственно синтезированной олигонуклеотидной последовательности. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная жидкость | 1,0 мл | 1 пробирка |
| ОКО | Отрицательный контрольный образец этапа экстракции, содержащий очищенную воду. Прозрачная бесцветная жидкость | 1,0 мл | 1 пробирка |
| К- | Отрицательный контрольный образец этапа амплификации, содержащий очищенную воду. Прозрачная бесцветная жидкость | 1,26 | 1 пробирка |
| Инструкция по применению | Бумажный носитель. | - | 1 шт. |
| Паспорт качества | Бумажный носитель, содержит информацию о серии, номере партии и контроле качества. | - | 1 шт. |

Реагенты набора упакованы в полиэтиленовый пакет с Zip-Lock замком, предназначенный для первичной упаковки набора реагентов. Пакет с реагентами, Инструкция по применению и Паспорт качества упаковываются в коробку.

2.3. Принцип определения

Выявление ДНК основано на амплификации видоспецифичного участка генома *Mycobacterium leprae*. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, полученные путём экстракции ДНК из биоптатов, соскобов с кожных покровов и мазков со слизистой оболочки носа. Амплификация фрагментов ДНК проводится в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых ДНК-зондов, каждый из которых содержит флуорофор на 5'-конце олигонуклеотида и гаситель флуоресценции BHQ на 3'-конце. Амплификация сопровождается разрушением ДНК-зонда экзонуклеазной активностью *Taq*-полимеразы, что приводит к увеличению общей флуоресценции ПЦР-смеси. Детектирование накопления ПЦР-продукта происходит в каждом цикле в соответствии с увеличением флуоресценции флуорофора в реакции, которое фиксируется детектором прибора.

Таблица 2

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

| Канал для флуорофора | FAM | Cy5 |
|----------------------|--|---|
| Мишень | ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> | ДНК ВКО |
| Область амплификации | элемент <i>RLEP</i> генома <i>Mycobacterium leprae</i> | Искусственно синтезированная последовательность |

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контрольный образец этапа экстракции (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать отрицательный контрольный образец этапа амплификации (К-) и положительный контрольный образец (ПКО-ML), а также экстрагированный образец ОКО. Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец этапа экстракции (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК *Mycobacterium leprae*. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК *Mycobacterium leprae* и контроля, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контрольный образец этапа амплификации (К-) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК *Mycobacterium leprae* и ВКО-ML. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Mycobacterium leprae* и ВКО-ML, начиная с этапа ПЦР.

Положительный контрольный образец (ПКО-ML) тестируется, начиная с этапа ПЦР. Реагент ПКО-ML входит в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительного контроля заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

3.1.2. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-ML), который добавляется в каждый исследуемый и отрицательный контрольный образец на этапе экстракции. Результаты исследования ВКО-ML должны соответствовать заданным критериям валидности для отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах, отрицательных на наличие ДНК *Mycobacterium leprae*, не обнаружена ДНК ВКО-ML, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

3.1.3. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

- 4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.
- 4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию и хранению образцов исследуемого материала, указанных в разделе «Исследуемый материал».
- 4.4. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО-ML. Без использования ВКО-ML невозможно провести оценку валидности постановки.
- 4.5. Набор предназначен для профессионального использования квалифицированным медицинским персоналом клиничко-диагностических лабораторий и медицинских учреждений, изучившим инструкцию по применению – врач-специалист (врач клинической лабораторной диагностики), медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), медицинский технолог (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 6 августа 2007 г. № 526 «Об утверждении профессиональных квалификационных групп должностей медицинских и фармацевтических работников»).
- 4.6. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 22 декабря 2015 г. № 173 «Об утверждении Правил классификации медицинских изделий в зависимости от потенциального риска применения»). Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

При использовании набора образуются отходы класса Б, которые утилизируются в соответствии с СП 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».

Неиспользованные наборы с истёкшим сроком годности утилизируются как отходы класса А согласно СП 2.1.3684-21.

Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с требованиями 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» и МУ 1.3.2569-09.

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил - «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Необходимо соблюдать требования правил техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены.

Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами реагентов.

Все работы должны выполняться в халате и одноразовых резиновых или латексных перчатках.

Все работы должны выполняться только с использованием одноразовых стерильных наконечников с фильтром для автоматических пипеток.

Все реактивы должны разливаться в условиях ламинарного шкафа (бокса).

Ламинарный шкаф (бокс), поверхности рабочих столов перед постановкой реакции ПЦР и по окончании работ обработать ультрафиолетовым излучением в течение 30 мин.

Рабочий стол, автоматические пипетки, штативы для пробирок, пинцеты, термостаты, центрифуги, вортексы должны быть обработаны стерилизующим раствором.

Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда и др., а также рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Подготовку реакционных смесей для проведения ПЦР следует проводить в ламинарном шкафу (боксе), снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света.

Набор и его компоненты не относятся к продукции, опасной в экологическом отношении. Специальных требований при применении набора по допустимым химическим и биологическим воздействиям на окружающую среду не предъявляется.

В случае повреждения упаковки или тары при транспортировании или хранении компонентов набора, в результате которого разлились жидкости, следует обработать поверхности столов, оборудования и др. дезинфицирующим раствором.

Набор должен применяться согласно инструкции по применению, утверждённой в установленном порядке.

При использовании набор реагентов допускается подвергать разморозке-заморозке не более 5 раз.

Набор должен использоваться в нормальных климатических условиях:

- температура окружающего воздуха - от плюс 18°C до плюс 25°C

- относительная влажность воздуха - от 40% до 60%
- атмосферное давление - от 740 до 760 мм.рт.ст.

Внимание! Не использовать набор при повреждении упаковки и внутреннего содержимого набора.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

6.1. Взятие исследуемого материала

- 6.1.1. скальпель для взятия образцов биоптатов кожи (не менее 3х3 мм);
- 6.1.2. зонд-тампон одноразовый стерильный ЮникорнмедТМ - ФСЗ 2012/11835 от 10.04.2023;
- 6.1.3. «Транспортный раствор (2)» - Набор реагентов для транспортировки и хранения клинического материала (Транспортный раствор) по ТУ 9398-550-23548172-2016 - РЗН 2017/6004 от 24.07.2017;
- 6.1.4. транспортная среда для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019 - РЗН 2020/9640 от 14.02.2020;
- 6.1.5. перчатки смотровые одноразовые нестерильные нитриловые SFM® - РУ от 15 июня 2023 года № РЗН 2019/8284.

6.2. Экстракция ДНК из клинического материала

- 6.2.1. Набор реагентов, предназначенный для получения препарата нуклеиновых кислот из биологического материала для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции:
 - набор реагентов для предобработки биоматериала при выделении нуклеиновых кислот (ПРОБА-ПК) по ТУ 21.20.23-107-46482062-2020. Комплектация 1 - РЗН 2021/14384 от 21.05.2021;
 - комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» по ТУ 9398-071-01897593-2008. Форма 2 - ФСР 2008/03147 от 06.08.2021.
- 6.2.2. Гомогенизатор для тканевых образцов - Гомогенизатор лабораторный TissueLyser LT (Qiagen, Германия), декларация ЕАЭС N RU Д-ДЕ.НА39.В.00716/20;
- 6.2.3. Бокс для чистых работ - бокс для чистых работ UVC/T-M-AR - РЗН 2023/19369 от 18.01.2023;
- 6.2.4. Центрифуга лабораторная - лабораторная микроцентрифуга MiniSpin с принадлежностями, вариант исполнения: 2. MiniSpin Plus - ФСЗ 2012/13316 от 05.12.2012;
- 6.2.5. Термостат - термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1- "ДНК-Техн." по ТУ 9452-003-46482062-2002 - ФСР 2012/13646 от 29.06.2012;

- 6.2.6. Аспиратор - аспиратор с сосудом-ловушкой FTA-1 - ФСЗ 2011/09791 от 25.05.2011;
- 6.2.7. Дозаторы пипеточные - дозаторы пипеточные переменного объема Eppendorf Research® Plus с принадлежностями, варианты исполнения: 1. Дозаторы механические переменного объема одноканальные - ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011;
- 6.2.8. Наконечники для дозаторов пипеточных - изделия Eppendorf из полимерных материалов для лабораторных исследований *in vitro*. 63. Наконечник с фильтром для ПЦР (eрT.I.P.S. Filter PCR) - ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009;
- 6.2.9. Перчатки - Перчатки смотровые одноразовые нестерильные нитриловые SFM® - РУ от 15 июня 2023 года № РЗН 2019/8284.

6.3. Подготовка реакционной смеси

- 6.3.1. Бокс для чистых работ - бокс для чистых работ UVC/T-M-AR - РЗН 2023/19369 от 18.01.2023;
- 6.3.2. Лабораторная микроцентрифуга - лабораторная микроцентрифуга MiniSpin с принадлежностями, вариант исполнения: 2. MiniSpin Plus - ФСЗ 2012/13316 от 05.12.2012;
- 6.3.3. Холодильник фармацевтический - холодильники фармацевтические по ТУ 9452-168-07503307-2004. 9. Холодильник фармацевтический ХФ-400-2 «ПОЗИС» - ФСР 2009/05705 от 30.08.2023;
- 6.3.4. Морозильник медицинский - морозильники медицинские ММШ-220 «POZIS» по ТУ 9452-195-07503307-2008 - ФСР 2008/03710 от 11.09.2023
- 6.3.5. Дозаторы пипеточные - дозаторы пипеточные переменного объема Eppendorf Research® Plus с принадлежностями, варианты исполнения: 1. Дозаторы механические переменного объема одноканальные - ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011;
- 6.3.6. Наконечники для дозаторов пипеточных - изделия Eppendorf из полимерных материалов для лабораторных исследований *in vitro*. 63. Наконечник с фильтром для ПЦР (eрT.I.P.S. Filter PCR) - ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009;
- 6.3.7. Штатив лабораторный - штатив лабораторный полимерный для пробирок для диагностики *in vitro* по ТУ 32.50.13-002-27278232-2021. Варианты исполнения: 1) Штатив RA-9602 для стрипованных микропробирок 0,2 мл, 96 лунок; 2) Штатив RA-7215 для микропробирок 1,5 мл, 72 лунки - РЗН 2022/16372 от 21.01.2022;
- 6.3.8. Перчатки - Перчатки смотровые одноразовые нестерильные нитриловые SFM® - РУ от 15 июня 2023 года № РЗН 2019/8284.

6.4. Внесение ДНК и проведение ПЦР

- 6.4.1. Бокс для чистых работ - бокс для чистых работ UVC/T-M-AR - РЗН 2023/19369 от 18.01.2023;
- 6.4.2. Лабораторная микроцентрифуга - лабораторная микроцентрифуга MiniSpin с принадлежностями, вариант исполнения: 2. MiniSpin Plus - ФСЗ 2012/13316 от 05.12.2012;
- 6.4.3. Микропробирка 1,5 мл - микропробирка коническая с интегрированной крышкой 1,5 мл (Эппендорф) (РЗН 2017/5595 от 06.04.2017);

- 6.4.4. Микропробирка 0,2 мл - изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований *in vitro*. 8. тонкостенные пробирки для ПЦР с выпуклой крышкой объемом 0,2 мл (ФСЗ 2012/11892 от 26.08.2014);
- 6.4.5. Морозильник медицинский - морозильники медицинские ММШ-220 «POZIS» по ТУ 9452-195-07503307-2008 - ФСР 2008/03710 от 11.09.2023;
- 6.4.6. Дозаторы пипеточные - дозаторы пипеточные переменного объема Eppendorf Research® Plus с принадлежностями, варианты исполнения: 1. Дозаторы механические переменного объема одноканальные - ФСЗ 2011/11028 от 15.11.2011
- 6.4.7. Наконечники для дозаторов пипеточных - изделия Eppendorf из полимерных материалов для лабораторных исследований *in vitro*. 63. Наконечник с фильтром для ПЦР (epT.I.P.S. Filter PCR) - ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009
- 6.4.8. Штатив лабораторный - штатив лабораторный полимерный для пробирок для диагностики *in vitro* по ТУ 32.50.13-002-27278232-2021. Варианты исполнения: 1) Штатив RA-9602 для стрипованных микропробирок 0,2 мл, 96 лунок; 2) Штатив RA-7215 для микропробирок 1,5 мл, 72 лунки - РЗН 2022/16372 от 21.01.2022;
- 6.4.9. Перчатки - Перчатки смотровые одноразовые нестерильные нитриловые SFM® - РУ от 15 июня 2023 года № РЗН 2019/8284;
- 6.4.10. Комплект многоразовой нестерильной медицинской одежды - комплект многоразовой нестерильной медицинской одежды по ТУ 32.50.50-002-03965413-2023 - РЗН 2024/22045 от 16.02.2024;
- 6.4.11. Шапочка медицинская одноразовая - шапочка медицинская одноразовая, из нетканого материала по ТУ 9398-004-0081581726-2015 - РЗН 2016/3790 от 17.03.2016;
- 6.4.12. Контейнеры для сбора острого инструментария и органических отходов - контейнеры для сбора острого инструментария и органических отходов класса Б,В одноразовые МП-01, МП-02 по ТУ 9398-002-84354588-2009 - ФСР 2009/06509 от 02.09.2022;
- 6.4.13. Контейнеры - контейнеры полимерные с перфорированным поддоном и крышкой для предстерилизационной очистки, химической дезинфекции и стерилизации медицинских изделий КДС-«КРОНТ» по ТУ 9451-009-11769436-2001 - ФСР 2009/06144 от 28.12.2023;
- 6.4.14. Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот - термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями, исполнения C1000 Touch - ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016.
- 6.4.15. Термошейкер медицинский TS: I. - Термошейкер медицинский TS: I. Термошейкер TS-100 для микропробирок и ПЦР планшетов - РЗН 2022/16327 от 19.01.2022.

Термоциклер должен соответствовать следующим требованиям:
наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5, Cy5.5 с характеристиками, указанными в таблице 3:

Таблица 3

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

| Канал для флуорофора | Длины волн, нм | | | |
|----------------------|----------------|----------|----------|----------|
| | Возбуждения | | Детекции | |
| | Минимум | Максимум | Минимум | Максимум |
| FAM | 450 | 470 | 510 | 530 |
| R6G | 515 | 532 | 545 | 580 |
| ROX | 565 | 585 | 605 | 650 |
| Cy5 | 620 | 640 | 660 | 690 |
| Cy5.5 | 660 | 690 | 705 | 750 |

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;
- точность поддержания температуры $\leq \pm 0,4^\circ\text{C}$;
- скорость нагрева не менее 2 °C/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °C/сек.

7. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Анализируемые образцы: биоптат, соскобы с кожных покровов и мазки со слизистой оболочки носа. Экстракция ДНК из клинического материала проводится с применением наборов для выделения ДНК, соответствующим требованиям, указанных в разделе «Дополнительные материалы и оборудование», согласно протоколу производителя.

Решение о выборе места взятия материала для исследования принимает лечащий врач на основании совокупности жалоб пациента и клинической картины.

Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортировка и предварительная обработка.

Исследование методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, поэтому взятие биологического материала необходимо проводить из места локализации инфекционного процесса.

Особенности взятия и предобработки материала:

7.1. Биоптаты кожи

- Взятие образцов биоптатов кожи (не менее 3x3 мм) производится скальпелем. Клинический материал (биоптаты кожи) помещают в «Транспортный раствор (2)» - Набор реагентов для транспортировки и хранения клинического материала (Транспортный раствор) по ТУ 9398-550-23548172-2016 - РЗН 2017/6004 от 24.07.2017.
- Предобработка: тщательно гомогенизировать полученный биоматериал (в присутствии 300 мкл лизирующего буфера из комплекта реагентов для экстракции ДНК с использованием автоматического гомогенизатора).
- Отобрать 100 мкл полученного гомогената комнатной температуры для выделения ДНК с использованием комплекта реагентов соответствующим требованиям, перечисленным в п.6.3, согласно протоколу производителя.
- Условия хранения и транспортировки:
 - Хранение клинического материала, предназначенного для выделения ДНК:

- при температуре 2–8 °С — в течение 24 часов;
 - при температуре минус 20 °С — в течение 1 месяца;
 - при температуре минус 70 °С — 1 год.
 - Допускается однократное замораживание-оттаивание клинического материала.
 - Транспортировка образцов в лабораторию осуществляется в термоконтейнере с температурой 2–8 °С — в течение 24 часов, при температуре -20°С в течение не более 5 суток с соблюдением правил транспортировки биологических образцов
- 7.2. Соскобы с кожных покровов и мазки со слизистой оболочки носа**
- Взятие образца: Клинический материал (соскобы с кожных покровов и мазки со слизистой оболочки носа) перенести сухим зонд-тампоном одноразовым стерильным ЮникорнмедТМ (РУ № ФСЗ 2011/09223 от 10.04.2023.). Рабочую часть зонда с тампоном поместить в «Транспортный раствор (2)» - Набор реагентов для транспортировки и хранения клинического материала (Транспортный раствор) по ТУ 9398-550-23548172-2016 - РЗН 2017/6004 от 24.07.2017 и в транспортную среду для биопроб СТОР-Ф по ТУ 21.20.23-101-46482062-2019 - РЗН 2020/9640 от 14.02.2020.
 - Для получения объективного результата необходимо, чтобы исследуемый материал содержал возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи и примеси крови. Неправильное взятие биоматериала может привести к невозможности получения достоверного результата и, вследствие этого, необходимости повторного забора биоматериала.
 - Предобработка: пробирки, содержащие анализируемый материал, центрифугировать при 13000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре от 18 до 25°С. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция) для проведения выделения ДНК.
 - Условия хранения и транспортировки:
 - Хранение клинического материала, предназначенного для выделения ДНК:
 - при температуре 2–8 °С — в течение 24 часов;
 - при температуре минус 20 °С — в течение 1 месяца;
 - при температуре минус 70 °С — 1 год.
 - Допускается однократное замораживание-оттаивание клинического материала.
 - Транспортировка образцов в лабораторию осуществляется в термоконтейнере с температурой 2–8 °С — в течение 24 часов, при температуре -20°С в течение не более 5 суток с соблюдением правил транспортировки биологических образцов

8. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1. Предел обнаружения

Для установления предела обнаружения используется стандартная панель контрольных образцов предприятия (СПКО ML1-ML10). В состав СПКО ML1-ML9 входят контрольные образцы, содержащие фрагмент генома *Mycobacterium leprae* в различной концентрации, в состав СПКО ML10 входит только очищенная вода. Для расчёта предела обнаружения использовали пробит-анализ с 95%-ой доверительной вероятностью.

Предел обнаружения

| Вид клинического материала | Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл | 95%-ый доверительный интервал, копий/мл |
|--|--|---|
| Биоптаты кожи | 1×10^3 | $9,17 \times 10^2 - 1,67 \times 10^3$ |
| Соскобы с кожных покровов и мазки со слизистой оболочки носа | 1×10^3 | $9,35 \times 10^2 - 1,24 \times 10^3$ |

8.2. Прецизионность в условиях повторяемости и воспроизводимости

Повторяемость и воспроизводимость определения были установлены путём тестирования положительных модельных образцов СПКО ML5 и ML7.

Значения показателей правильности определения (повторяемость и воспроизводимость) не должны превышать следующие значения: стандартное отклонение должно быть не более 1,9; коэффициент вариации не более 5,5%.

Воспроизводимость. Контроль прецизионности в условиях воспроизводимости проводят методом ПЦР: определение стандартного отклонения и коэффициента вариации в тестировании положительных и отрицательных модельных образцов разными операторами, в разные дни, на разных приборах, разных серий набора реагентов.

Повторяемость. Контроль прецизионности в условиях повторяемости проводят методом ПЦР: определение стандартного отклонения и коэффициента вариации в тестировании положительных и отрицательных модельных образцов, с использованием одного и того же метода, одного и того же оборудования, одним и тем же оператором, в одной и той же лаборатории в течение короткого периода времени.

Таблица 5

Повторяемость измерения

| Мишень | Концентрация, копий/мл | Количество повторов | Среднее значение, Ct | Стандартное отклонение | Коэффициент вариации, % |
|-----------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Mycobacterium leprae</i> | 1×10^4 | 15 | 29,01 | 0,28 | 0,98 |
| | 1×10^3 | 15 | 27,14 | 0,27 | 0,90 |

Таблица 6

Воспроизводимость измерения

| Мишень | Концентрация, копий/мл | Количество повторов | Среднее значение, Ct | Стандартное отклонение | Коэффициент вариации, % |
|-----------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Mycobacterium leprae</i> | 1×10^4 | 40 | 29,59 | 0,34 | 1,18 |
| | 1×10^3 | 40 | 27,58 | 0,25 | 0,83 |

8.3. Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность набора «*M. leprae* ПЦР РВ» оценивалась тестированием ДНК следующих микроорганизмов, входящих в стандартные контрольные образцы предприятия СПКО К1-К10. Микроорганизмы приведены в таблице №7. Для тестирования использовались образцы с концентрацией не менее 1×10^6 копий/мл.

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

| Микроорганизмы | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Mycobacterium leprae</i> | <i>Mycobacterium xenopi</i> |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> | <i>Mycobacterium goodii</i> |
| <i>Mycobacterium peregrinum</i> | <i>Mycobacterium avium</i> |
| <i>Mycobacterium chelonae</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| <i>Mycobacterium intracellulare</i> | ВКО-ML |

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов с использованием набора «*M. leprae* ПЦР РВ» перекрёстных реакций выявлено не было.

8.4. Диагностические характеристики:

Таблица 8

Диагностические характеристики набора

| Тип биоматериала | Возбудитель | Диагностическая специфичность | Диагностическая чувствительность |
|--|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Биоптаты кожи | <i>Mycobacterium leprae</i> | 100% | 100% |
| Соскобы с кожных покровов и мазки со слизистой оболочки носа | <i>Mycobacterium leprae</i> | 100% | 100% |

Диагностическая чувствительность набора реагентов – 100% (доверительный интервал 96,47 – 100%, с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов – 100% (доверительный интервал 96,47 – 100%, с доверительной вероятностью 95%).

8.5. Клиническая эффективность

По результатам клинико-лабораторных испытаний были получены результаты, подтверждающие клиническую эффективность набора реагентов. Результаты представлены в таблицах 9-13.

Таблица 9

| Аналитическая чувствительность | | | |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| | Серия 240323 – набор 1 | Серия 240323 – набор 2 | Серия 240423 |
| Стандартное отклонение | 0,19 | 1,67 | 0,35 |
| Коэффициент вариации | 0,59 | 5,32 | 1,09 |

Таблица 10

| Подтверждение предела обнаружения | | | | | |
|--|-----------------|------------|------------------------|-------------------------|---------|
| Обозначение образца | Серия 240323 | | | | |
| | Кол-во повторов | FAM, Ср Ct | Стандартное отклонение | Коэффициент вариации, % | Sy5, Ct |
| ML7 (ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> в концентрации 1×10^3) | 10 | 34,023 | 0,26 | 0,78 | 12,98 |

| | | | | | |
|-----------|--|--|--|--|--|
| копий/мл) | | | | | |
|-----------|--|--|--|--|--|

Таблица 11

| Оценка влияние интерферирующих веществ | | | | | |
|---|-----------------|--------------|------------|--------------|------------|
| Обозначение образца | КОЛ-ВО повторов | Серия 240323 | | Серия 240423 | |
| | | FAM, Cp Ct | Cy5, Cp Ct | FAM, Cp Ct | Cy5, Cp Ct |
| I1 (гемоглобин 250 мг/мл) | 3 | 33,87 | 16,30 | 32,69 | 15,24 |
| I2 (мирамистин 0,001 % действующего вещества в 100 мкл) | 3 | 33,99 | 16,40 | 32,85 | 14,56 |

Таблица 12

| Влияние потенциально перекрёстно реагирующих веществ (Аналитическая специфичность) | | | | | |
|---|-----------------|--------------|------------|--------------|------------|
| Обозначение образца | Кол-во повторов | Серия 240323 | | Серия 240423 | |
| | | FAM, Cp Ct | Cy5, Cp Ct | FAM, Cp Ct | Cy5, Cp Ct |
| K2 (<i>Mycobacterium fortuitum</i>) | 3 | – | 12,27 | – | 12,33 |
| K3 (<i>Mycobacterium peregrinum</i>) | 3 | – | 12,38 | – | 11,74 |
| K4 (<i>Mycobacterium chelonae</i>) | 3 | – | 12,68 | – | 12,13 |
| K5 (<i>Mycobacterium intracellulare</i>) | 3 | – | 12,47 | – | 11,87 |
| K6 (<i>Mycobacterium xenopi</i>) | 3 | – | 12,40 | – | 11,81 |
| K7 (<i>Mycobacterium gordonae</i>) | 3 | – | 12,51 | – | 12,12 |
| K8 (<i>Mycobacterium avium</i>) | 3 | – | 12,48 | – | 11,93 |
| K9 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) | 3 | – | 12,44 | – | 11,69 |

Таблица 13

| Отрицательный контроль | | | | | |
|-------------------------------|-----------------|--------------|------------|--------------|------------|
| Обозначение образца | Кол-во повторов | Серия 240323 | | Серия 240423 | |
| | | FAM, Cp Ct | Cy5, Cp Ct | FAM, Cp Ct | Cy5, Cp Ct |
| K10 | 10 | – | 11,72 | – | 12,16 |

Протестировано 85 клинических образцов, содержащих ДНК *Mycobacterium leprae* и 85 образцов, отрицательных на ДНК *Mycobacterium leprae*.

В клиничко-лабораторном испытании были использованы остаточные образцы. Информированное согласие пациентов на проведение клинических испытаний не требуется в виду особенностей получения клинического материала (материал был получен из остаточных образцов после проведения клинически значимых исследований). Результаты исследования приведены в таблице 14.

Таблица 14

Результаты клиничко-лабораторных испытаний

| Образец | Характеристика образца | Количество повторов | Результат тестирования набором « <i>M. leprae</i> ПЦР РВ» | Совпадение с референтной последовательностью, % |
|---------|---|---------------------|---|---|
| C+ | пробы биоптата положительные по содержанию возбудителя <i>Mycobacterium leprae</i> | 25 | Обнаружена ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> | 100 |
| D+ | пробы соскобов с кожных покровов положительные по содержанию возбудителя <i>Mycobacterium leprae</i> | 25 | Обнаружена ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> | 100 |
| E+ | пробы мазков со слизистой оболочки носа положительные по содержанию возбудителя <i>Mycobacterium leprae</i> | 25 | Обнаружена ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> | 100 |
| F+ | проба биоматериала (любого вида, может быть пулирована) положительная по содержанию возбудителя <i>Mycobacterium leprae</i> | 10 | Обнаружена ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> | 100 |
| C- | пробы биоптата отрицательные по содержанию возбудителя <i>Mycobacterium leprae</i> | 25 | Не обнаружена ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> | - |
| D- | пробы соскобов с кожных покровов отрицательные по содержанию возбудителя <i>Mycobacterium leprae</i> | 25 | Не обнаружена ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> | - |
| E- | пробы мазков со слизистой оболочки носа отрицательные по содержанию | 25 | Не обнаружена ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> | - |

| Образец | Характеристика образца | Количество повторов | Результат тестирования набором « <i>M. leprae</i> ПЦР РВ» | Совпадение с референтной последовательностью, % |
|---------|---|---------------------|---|---|
| | возбудителя <i>Mycobacterium leprae</i> | | | |
| F- | проба биоматериала (любого вида, может быть пулирована) отрицательная по содержанию возбудителя <i>Mycobacterium leprae</i> | 10 | Не обнаружена ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> | - |

Выводы:

- Диагностическая чувствительность медицинского изделия составила 100% (доверительный интервал 96,47 - 100%, с доверительной вероятностью 95%), диагностическая специфичность составила 100% (доверительный интервал 96,47 - 100%, с доверительной вероятностью 95%).
- Сравнение результатов, полученных при использовании медицинского изделия «Набор реагентов для проведения лабораторных диагностических исследований *in vitro* с целью качественного определения ДНК *Mycobacterium leprae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «*M. leprae* ПЦР РВ» по ТУ 21.20.23-001-86582224-2023» с результатами, полученными при помощи референтного метода показало, что характеристики исследуемого медицинского изделия соответствуют характеристикам, заявленным в технической и эксплуатационной документации производителя.

9. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом материале, на эффективность ПЦР при использовании набора «*M. leprae* ПЦР РВ» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоптатов и соскобов с кожных покровов и мазков со слизистой оболочки носа на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 15, в максимально возможной концентрации для данных видов биоматериала:

Таблица 15

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора

| Вид биоматериала | Интерферент | | Концентрация |
|------------------|-------------|------------|--------------|
| | Эндогенный | Экзогенный | |
| Биоптат | гемоглобин | - | 250 мг/мл |

| Вид биоматериала | Интерферент | | Концентрация |
|--|-------------|------------|---|
| | Эндогенный | Экзогенный | |
| | - | мирамистин | 0,001 % действующего вещества в 100 мкл |
| Соскобы с кожных покровов и мазки со слизистой оболочки носа | гемоглобин | - | 250 мг/мл |
| | - | мирамистин | 0,001 % действующего вещества в 100 мкл |

10. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

10.1. Подготовка реагентов и материалов

В соответствии с МУ 1. 3.2569–09.

10.2. Проведение исследований

Набор реагентов «*M. leprae* ПЦР РВ» должен применяться согласно инструкции по применению. Набор предназначен для профессионального использования квалифицированным медицинским персоналом клинико-диагностических лабораторий и медицинских учреждений, изучившим инструкцию по применению – врач-специалист (врач клинической лабораторной диагностики), медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), медицинский технолог. Исследования с использованием набора «*M. leprae* ПЦР РВ» проводятся в боксированных помещениях, оборудованных системами приточно-вытяжной вентиляции или боксах микробиологической безопасности II класса. Набор должен использоваться в нормальных климатических условиях:

- температура окружающего воздуха - от плюс 18°C до плюс 25°C
- относительная влажность воздуха - от 40% до 60%
- атмосферное давление - от 740 до 760 мм.рт.ст.

Внимание! Не допускается использование набора при повреждении упаковки и изменении внешнего вида компонентов набора реагентов.

10.3. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

При проведении исследования каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контрольного образца этапа экстракции (ОКО), а также во все экстрагируемые образцы следует вносить внутренний контрольный образец (ВКО).

10.4. Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

Смешивание реагентов ПЦР следует проводить в отдельной зоне. Не допускается перенос расходных материалов, реагентов из других зон. Обязательно использование халатов, предназначенных только для данного помещения.

Общий объем реакционной смеси – 20 мкл, включая объем пробы ДНК – 5 мкл.

1. Рассчитать объёмы реагентов, требующиеся для приготовления реакционной смеси. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 16

Расчет объёмов компонентов реакционной смеси

| Реагент | Объём, мкл | Обозначения |
|--------------|------------|--|
| ПЦР-смесь-ML | 1,0*(N+1) | N – количество образцов для проведения ПЦР, включая контроли |
| ПЦР-буфер-ML | 5,0*(N+1) | |
| К- | 9,0*(N+1) | |

2. Разморозить ПЦР-буфер-ML, ПЦР-смесь-ML и К-. Перемешать содержимое пробирок, осадить капли на вортексе.
3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объёмах, рассчитанных в п.1. Перемешать и осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для проведения исследования.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.
6. Внести в пробирки с реакционной смесью по **5 мкл** проб ДНК, полученных в результате экстракции.
7. Внести контрольные образцы:
 - положительный контрольный образец **ПКО-ML** в одну пробирку **5 мкл**
 - отрицательный контрольный образец этапа экстракции **ОКО** в одну пробирку **5 мкл**
 - отрицательный контрольный образец этапа амплификации **К-** в одну пробирку **5 мкл**
8. Пробирки или стрипы плотно закрыть и перенести в зону амплификации.
9. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме реального времени для выполнения программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно таблице 17:

Таблица 17

Программа амплификации

| Цикл | Температура, °С | Время | Измерение флуоресценции | Кол-во циклов |
|------|-----------------|--------|-------------------------|---------------|
| 1 | 95 | 5 мин | - | 1 |
| 2 | 95 | 10 сек | - | 40 |
| 3 | 60 | 20 сек | FAM, Cy5 | |
| 4 | 72 | 30 сек | - | |

10. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора. При постановке в амплификатор планшетного типа рекомендуется осадить капли со стенок пробирок на вортексе.
11. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

10.5. Анализ результатов

Учёт результатов проводят в ручном режиме с использованием программного обеспечения прибора, используемого для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Обработка и расчёт результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов.

Уровень пороговой линии выставляется 10-20% от максимального уровня разгорания флуоресценции.

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по двум каналам детекции, указанным в таблице 18:

Таблица 18

Детекция флуоресцентного сигнала

| Канал флуорофора | FAM | Cy5 |
|----------------------|---------------------------------|-----|
| Продукт амплификации | ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> | ВКО |

10.6. Интерпретация результатов

Результат амплификации по каналу считается положительным, если кривая флуоресценции имеет типичную для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией в области характерного экспоненциального подъема флуоресценции; отрицательным, если отсутствует кривая типичной формы и сомнительным во всех остальных случаях. При этом пороговую линию для каждого канала устанавливают на 10-20% от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО-ML для канала FAM и ОКО для канала Cy5.

Интерпретация результатов для исследуемых образцов представлена в таблице 19:

Таблица 19

Интерпретация результатов для исследуемых образцов

| Результат | | Интерпретация |
|--|---|---|
| FAM | Cy5 | |
| Значение Ct меньше граничного (<35 Ct) | Значение Ct меньше граничного (<33 Ct) | Обнаружена ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> |
| Значение Ct отсутствует | Значение Ct меньше граничного (<33 Ct) | Не обнаружена ДНК <i>Mycobacterium leprae</i> |
| Значение Ct более граничного (>35 Ct) | Значение Ct меньше граничного (<33 Ct) | Сомнительный! Требуется повторить анализ, начиная с этапа амплификации |
| Значение Ct отсутствует | Значение Ct отсутствует или более граничного (>33 Ct) | Невалидный! Требуется повторить анализ, начиная с этапа экстракции |

10.7. Критерии валидности для контрольных образцов

Таблица 20

Критерии валидности для контрольных образцов

| Контроль | Результат амплификации по каналу для флуорофора | |
|---|---|--|
| | FAM | Sy5 |
| ПКО-ML | Определено значение Ct не более 35 цикла | Значение Ct отсутствует |
| ОКО (отрицательный контрольный образец этапа экстракции) | Значение Ct отсутствует | Определено значение Ct не более 33 цикла |
| К- (отрицательный контрольный образец этапа амплификации) | Значение Ct отсутствует | Значение Ct отсутствует |

Результаты не подлежат учету в случае:

1. Отсутствия положительного сигнала по каналам FAM в пробе с положительным контрольным образцом ПКО-ML, что может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации или о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В этом случае требуется повторная амплификация образцов.

2. Наличия положительного сигнала по каналу FAM в отрицательном контрольном образце этапа амплификации (К-), что может свидетельствовать о контаминации реактивов или исследуемых образцов. В этом случае необходимо повторить исследование для всех положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК и предпринять необходимые меры по выявлению и устранению источника контаминации.

3. Отсутствия положительного сигнала по каналу Sy5 в отрицательном контрольном образце этапа экстракции (ОКО), что может свидетельствовать об ошибках на этапе экстракции ДНК или контаминацией продуктами амплификации. В этом случае необходимо повторить анализ образцов, начиная с этапа экстракции ДНК и предпринять необходимые меры по выявлению и устранению источника контаминации.

11. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ И ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕМОНТ

Набор реагентов «*M. leprae* ПЦР РВ» техническому обслуживанию и техническому ремонту не подлежит.

12. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора составляет 12 месяцев с даты изготовления. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.

13. ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ

Транспортировка:

Транспортирование наборов – в термоконтейнере, в котором с помощью сухого льда или аккумуляторов холода поддерживается необходимый температурный режим (не выше

+5°C), не более 5 суток, транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок.

При транспортировке набора не допускать прямого воздействия солнечного света.

При транспортировке набора необходимо защищать от воздействия влаги.

При транспортировке набора необходимо соблюдать требования манипуляционных знаков, указанных на групповой (транспортировочной) упаковке набора реагентов.

Хранение:

Хранение наборов должно осуществляться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре не выше минус 20°C в морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры, в защищённом от света месте в течение всего срока годности.

После вскрытия упаковок предусмотрено хранение при температуре не выше минус 20°C в морозильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры в течение всего срока годности.

14. УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения и клинично-диагностических лабораторий.

15. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества и обращения набора реагентов «*M. leprae* ПЦР РВ», следует обращаться по адресу: ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, 107076, Москва, ул. Короленко, д.3, стр.6, +7 (499)-785-20-15, info@snikvi.ru.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов «*M. leprae* ПЦР РВ», нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Символы, используемые в документации производителя

| № | Символ | Обозначение |
|----|---|---|
| 1 |  | Изготовитель - указывает изготовителя медицинского изделия |
| 2 |  | Номер по каталогу - указывает номер изделия по каталогу изготовителя, с помощью которого изделие может быть идентифицировано |
| 3 | Серия № | Указывает номер (код) серии изготовления изделия |
| 4 |  | Код партии - указывает код партии или серии изготовления изделия |
| 5 |  | Дата изготовления - указывает дату, когда было изготовлено медицинское изделие |
| 6 |  | Использовать до - указывает дату, после истечения которой изделие не должно применяться или использоваться |
| 7 |  | Верхняя граница температурного диапазона - указывает верхнюю границу температурного диапазона, в пределах которого медицинское изделие может надежно сохраняться |
| 8 |  | Содержимого достаточно для проведения n тестов - указывает совокупное количество (n) тестов <i>in vitro</i> , которые могут быть выполнены с этим изделием |
| 9 |  | Не использовать при повреждении упаковки - указывает, что в случае повреждения или вскрытия упаковки медицинское изделие применять нельзя |
| 10 |  | Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i> - указывает, что медицинское изделие является изделием для диагностики <i>in vitro</i> |
| 11 |  | Обратитесь к инструкции по применению - указывает на необходимость для пользователя ознакомиться с инструкцией по применению |
| 12 |  | Осторожно! - указывает на необходимость для пользователя, ознакомиться с важной информацией инструкции по применению, такой как предупреждения и меры предосторожности, которые не могут по разным причинам быть размещены на медицинском изделии |
| 13 |  | Специальный знак обращения медицинского изделия на рынке Евразийского экономического союза |
| 14 |  | «Вверх» |
| 15 |  | Хрупкое, обращаться осторожно - указывает, что медицинское изделие может быть сломано или повреждено, если с ним не обращаться осторожно |
| 16 |  | Не допускать воздействия солнечного света - указывает, что медицинское изделие необходимо защищать от воздействия солнечного света |
| 17 |  | Беречь от влаги - указывает, что медицинское изделие необходимо защищать от воздействия влаги |
| 18 |  | «Не утилизировать с бытовым мусором» |
| 19 |  | «Запрет на повторное применение» - указывает, что медицинское изделие предназначено только для однократного применения |

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 25 ЛИСТОВ

«28» мая 2024 год

Директор ФГБУ «ГНИДК»
Минздрава России
Кубанов А. А.

