

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК *Rickettsia species*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Rickettsia species*»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК *Rickettsia species* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Rickettsia species*» предназначен для выявления ДНК *Rickettsia species* (возбудителей клещевых риккетсиозов) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени, с целью их лабораторной дифференциации от других патогенов (бактерий и вирусов), передаваемых человеку клещами.

Набор может быть применён для анализа клинического материала (плазма крови (полученная с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта), лейкоцитарная фракция крови, биоптат, цельная кровь, первичный аффект (место укуса клещей), а также для анализа клещей.

Выделение ДНК из клинического материала проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 1000» и «РеалБест экстракция 100».

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

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного

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

участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров ДНК-полимеразой.

В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле 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 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 внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка, 1 мл;
- реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 5 пробирок, каждая на 10 определений;
- раствор для восстановления (РВ) – 1 флакон, 2 мл;
- раствор для подготовки образцов (РПО) – 4 флакона по 4 мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ*

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Rickettsia species* определяется по четырём образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Rickettsia species* (СОП 05-2-655), с содержанием ДНК *Rickettsia species* по 100 копий в пробе – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Rickettsia species* определяется по четырём образцам, приготовленным из отрицательных сывороток стандартной панели предприятия, СПП ОКС (СПП 05-2-214) – 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Rickettsia species*: клинические испытания, проведенные на 229 положительных образцах, показали 100 % чувствительность

(интервал 98,7 % - 100 %; с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Rickettsia species*: клинические испытания, проведенные на 249 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 98,8 % - 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 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР/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».

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

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

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

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

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

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые класси-

фицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма «Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма «Qiagen», Германия) или планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

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

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– дозаторы механические, одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

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

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, фирма «FinnTip», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);

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

– пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (например, фирма «Ахуген», США).

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО, который является компонентом данного набора, и ОКО, который является компонентом набора на выделение.

6.1.1. Плазма (полученная с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта), лейкоцитарная фракция, биоптат.

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 1000», «РеалБест экстракция 100», согласно инструкциям по применению.

6.1.2. Цельная кровь.

Для предварительной обработки образцов цельной крови рекомендуется использовать набор реагентов «РеалБест Гемолитик» (АО «Вектор-Бест») согласно инструкции по применению.

6.1.3. Первичный аффект.

У людей в месте присасывания клещей, зараженных риккетсиями, в случае инфицирования последними часто образуется очаг некроза и воспаления (первичный аффект). В области первичного аффекта, под тонкой коркой остатков кожи и частицами гноя, на поверхности тканей, скапливается большое количество риккетсий, жизнеспособность которых сохраняется в течение нескольких дней с момента присасывания клеща даже после начала антибиотикотерапии. ПЦР-анализ образцов, полученных в результате смывов с первичного аффекта, в диагностическом плане имеет серьезное преимущество по сравнению с анализом образцов цельной крови и ее производных, где возбудитель находится непродолжительное время в период лихорадочного состояния больного.

Подготовка смывов с первичного аффекта.

Ватную палочку обильно смочить физиологическим раствором и размочить ей корочку в месте первичного аффекта в течение 1-2 минут. Удалив поверхностный слой остатков кожи, провести ватной палочкой 5-7 раз по размоченному первичному аффекту, слегка проникая кончиком ватного тампона к тканям, находящимся под слоем гноя. Физиологический раствор с ватной палочки отжать об стенку пробирки (типа Eppendorf на 1,5 мл), содержащую 300 мкл РПО. Повторить процедуру смыва. Кончик ватной палочки опустить на дно пробирки, тщательно перемешать, остатки жидкости отжать о стенку пробирки, ватную палочку извлечь и поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Пробирку плотно закрыть. Тщательно взболтать пробирку на шейкере (20-30 секунд). Использовать для выделения 100 мкл полученного образца.

Выделение ДНК из 100 мкл образцов смывов с первичного аффекта производится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», согласно инструкциям по применению.

6.1.4. Клещи.

Выделение ДНК из суспензии клещей проводят с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100». При приготовлении суспензии клещей используется РПО. Процедура при-

готовления суспензии клещей с использованием РПО описана в инструкции по применению набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

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

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника и выдержать их при температуре (18-25) °С в течение 30 минут. Затем вскрыть упаковку, отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с РС.

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 определений.

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

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

6.2.2. В пробирку с РС добавить 300 мкл РВ, аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при температуре (18-25) °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

РВ после вскрытия флакона хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

Восстановленную РС использовать в день проведения анализа.

6.2.3. ПКО после вскрытия пробирок хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

6.2.4. РПО после вскрытия флакона хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли).

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

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

7.2. Во все пробирки дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по 25 мкл РС.

7.3. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром. Плотно закрыть пробирки крышками.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК возбудителей инфекции и детекции сигналов флуоресценции (программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору):

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

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

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

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

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд);

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C.

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

«FAM» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«ROX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК *Rickettsia species*.

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

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;

– нарастание сигнала амплификации ДНК *Rickettsia species* (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу

«ROX»/«Orange».

Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4).

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

8.2. Учёт результатов.

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

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекции), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX»/«Orange» больше 40 или не определяется.

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

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Rickettsia species*, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

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

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

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

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения

АО «Вектор-Бест»



А.В. Трухина

Директор по производству

АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Ректор ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России

д.м.н., профессор



И.О. Маринкин

“28” июля 201

“28” июля 2017 г.

[illegible]

“ 28 ” *Иванов* 2017 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

« 21 » 01 2017 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК *Rickettsia species*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Rickettsia species*»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК *Rickettsia species* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Rickettsia species*» предназначен для выявления ДНК *Rickettsia species* (возбудителей клещевых риккетсиозов) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени, с целью их лабораторной дифференциации от других патогенов (бактерий и вирусов), передаваемых человеку клещами.

Набор может быть применён для анализа клинического материала (плазма крови (полученная с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта), лейкоцитарная фракция крови, биоптат, цельная кровь, первичный аффект (место укуса клещей), а также для анализа клещей.

Выделение ДНК из клинического материала проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 1000» и «РеалБест экстракция 100».

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

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная дена-

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

турация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров ДНК-полимеразой.

В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле 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 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 внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка, 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок;
- раствор для подготовки образцов (РПО) – 4 флакона по 4 мл.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ*

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Rickettsia species* определяется по четырём образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия СОП ДНК *Rickettsia species* (СОП 05-2-655), с содержанием ДНК *Rickettsia species* по 100 копий в пробе – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Rickettsia species* определяется по четырём образцам, приготовленным из отрицательных сывороток стандартной панели предприятия, СПП ОКС (СПП 05-2-214) – 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Rickettsia species*: клинические испытания, проведенные на 229 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 98,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Rickettsia species*: клинические испытания, проведенные на 249 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

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

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

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

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

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

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (например, фирма «Eppendorf», Германия);
- встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «FinnTip», Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО, который является компонентом данного набора, и ОКО, который является компонентом набора на выделение.

6.1.1. Плазма (полученная с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта), лейкоцитарная фракция, биоптат.

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 1000», «РеалБест экстракция 100», согласно инструкциям по приме-

нию.

6.1.2. Цельная кровь.

Для предварительной обработки образцов цельной крови рекомендуется использовать набор реагентов «РеалБест Гемолитик» (АО «Вектор-Бест») согласно инструкции по применению.

6.1.3. Первичный аффект.

У людей в месте присасывания клещей, зараженных риккетсиями, в случае инфицирования последними часто образуется очаг некроза и воспаления (первичный аффект). В области первичного аффекта, под тонкой коркой остатков кожи и частицами гноя, на поверхности тканей, скапливается большое количество риккетсий, жизнеспособность которых сохраняется в течение нескольких дней с момента присасывания клеща даже после начала антибиотикотерапии. Поэтому ПЦР-анализ образцов, полученных в результате смывов с первичного аффекта, в диагностическом плане имеет серьезное преимущество по сравнению с анализом образцов цельной крови и ее производных, где возбудитель находится непродолжительное время в период лихорадочного состояния больного.

Подготовка смывов с первичного аффекта.

Ватную палочку обильно смочить физиологическим раствором и размочить ей корочку в месте первичного аффекта в течение 1-2 минут. Удалив поверхностный слой остатков кожи, провести ватной палочкой 5-7 раз по размоченному первичному аффекту, слегка проникая кончиком ватного тампона к тканям, находящимся под слоем гноя. Физиологический раствор с ватной палочки отжать об стенки пробирки (типа Eppendorf на 1,5 мл), содержащую 300 мкл РПО. Повторить процедуру смыва. Кончик ватной палочки опустить на дно пробирки, тщательно перемешать, остатки жидкости отжать о стенки пробирки, ватную палочку извлечь и поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором. Пробирку плотно закрыть. Тщательно взболтать пробирку на шейкере (20-30 секунд). Использовать для выделения 100 мкл полученного образца.

Выделение ДНК из 100 мкл образцов смывов с первичного аффекта производится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», согласно инструкциям по применению.

6.1.4. Клещи.

Выделение ДНК из суспензии клещей проводят с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100». При приготовлении суспензии клещей используется РПО. Процедура приготовления суспензии клещей с использованием РПО описана в инструкции по применению набора реагентов «РеалБест экстракция 100».

Выделенную ДНК из клинических образцов хранить при температуре (2-8) °C не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

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

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

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

6.2.3 РПО после вскрытия флакона хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

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

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК возбудителей инфекции и детекции сигналов флуоресценции (программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору):

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.

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

«FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«ROX» – для регистрации сигнала ДНК *Rickettsia species*

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

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Rickettsia species* (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 нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4.).

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

8.2. Учёт результатов.

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

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекции), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

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

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Rickettsia species*, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного ви-

да, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

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

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

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

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения

АО «Вектор-Бест»



А.В. Трухина

Директор по производству

АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Ректор ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России

д.м.н., профессор



И.О. Маринкин

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н.

“28” июля 201 7 г.



Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 8 листов.

Директор по технологии и качеству
АО «Вектор-Бест»

Масяго А.В.

“28” июля 201 7 г.



ПАСПОРТ № 2350-16

РеалБест ДНК Rickettsia species (комплект 1)

Набор реагентов для выявления ДНК Rickettsia species методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

ТУ 9398-606-23548172-2016

Номер серии 1

Дата изготовления 2016-08-23

Дата выдачи паспорта 2016-08-23

Срок годности наборов до 2017-08-23

Хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.

Состав набора	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Положительный контрольный образец универсальный, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1,0 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1,0 мл (соответствует)
Готовая реакционная смесь для ПЦР, серия 1	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок)	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок) (соответствует)
Раствор для подготовки образцов, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 4,0 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 4,0 мл (соответствует)
Принадлежности:		
Оптическая пленка	1 лист	1 лист (соответствует)
Технические характеристики		
Чувствительность (выявление 100 копий ДНК Rickettsia species в пробе СОП 05-2-655), %	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК Rickettsia species (по стандартной панели предприятия образцов контрольных сывороток крови СПП 05-2-214), %	100	100 (соответствует)

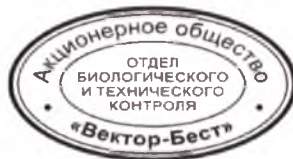
В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям ТУ 9398-606-23548172-2016

Начальник ОБТК

В.В. Шапоров

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 2351-16

РеалБест ДНК Rickettsia species (комплект 2)

Набор реагентов для выявления ДНК Rickettsia species методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

ТУ 9398-606-23548172-2016

Номер серии

Дата изготовления 2016-08-23
Дата выдачи паспорта 2016-08-23

Срок годности наборов до 2017-08-23

Хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.



Состав набора	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Положительный контрольный образец универсальный, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1,0 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1,0 мл (соответствует)
Реакционная смесь для ПЦР, серия 1	Аморфная масса белого цвета, 5 пробирок, каждая на 10 определений	Аморфная масса белого цвета, 5 пробирок, каждая на 10 определений (соответствует)
Раствор для восстановления, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон, 2,0 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон 2,0 мл (соответствует)
Раствор для подготовки образцов, серия 1	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 4,0 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 4,0 мл (соответствует)
Технические характеристики		
Чувствительность (выявление 100 копий ДНК Rickettsia species в пробе СОП 05-2-655), %	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК Rickettsia species (по стандартной панели предприятия образцов контрольных сывороток крови СПП 05-2-214), %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям
ТУ 9398-606-23548172-2016

Зачальник ОБТК

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 2460-16

РеалБест ДНК Rickettsia species (комплект 1)

Набор реагентов для выявления ДНК Rickettsia species методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

ТУ 9398-606-23548172-2016

Номер серии 2

Дата изготовления 2016-08-30

Дата выдачи паспорта 2016-08-30

Срок годности наборов до 2017-08-30

Хранить при температуре 2-8°C. Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 25°C не более 10 суток.

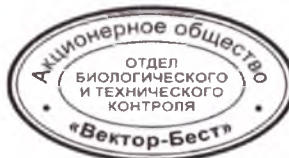
Состав набора	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Положительный контрольный образец универсальный, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1,0 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1,0 мл (соответствует)
Готовая реакционная смесь для ПЦР, серия 2	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок)	Аморфная масса белого цвета, 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок) (соответствует)
Раствор для подготовки образцов, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 4,0 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 4,0 мл (соответствует)
Принадлежности:		
Оптическая пленка	1 лист	1 лист (соответствует)
Технические характеристики		
Чувствительность (выявление 100 копий ДНК Rickettsia species в пробе СОП 05-2-655), %	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК Rickettsia species (по стандартной панели предприятия образцов контрольных сывороток крови СПП 05-2-214), %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям ТУ 9398-606-23548172-2016

Начальник ОБТК

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 2461-16

РеалБест ДНК Rickettsia species (комплект 2)

Набор реагентов для выявления ДНК Rickettsia species методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

ТУ 9398-606-23548172-2016

Номер серии 2

Дата изготовления 2016-08-30

Дата выдачи паспорта 2016-08-30

Срок годности наборов до 2017-08-30

Хранить при температуре 2-8°С. Транспортировать при температуре 2-8°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

Состав набора	Характеристика и нормы	Рез-ты контроля
Положительный контрольный образец универсальный, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1,0 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1,0 мл (соответствует)
Реакционная смесь для ПЦР, серия 2	Аморфная масса белого цвета, 5 пробирок, каждая на 10 определений	Аморфная масса белого цвета, 5 пробирок, каждая на 10 определений (соответствует)
Раствор для восстановления, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон, 2,0 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 1 флакон 2,0 мл (соответствует)
Раствор для подготовки образцов, серия 2	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 4,0 мл	Прозрачная бесцветная жидкость, 4 флакона по 4,0 мл (соответствует)
Технические характеристики		
Чувствительность (выявление 100 копий ДНК Rickettsia species в пробе СОП 05-2-655), %	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК Rickettsia species (по стандартной панели предприятия образцов контрольных вороток крови СПП 05-2-214), %	100	100 (соответствует)

В комплект поставки входят: набор реагентов, инструкция по применению, паспорт.

Заключение: Показатели качества, комплектность, упаковка и маркировка соответствуют требованиям
ТУ 9398-606-23548172-2016

Менеджер ОБТК



В.В. ШАПРОВ





Пропиновано, пронумеровано
и скреплено печатью
4 листов

[Handwritten signature]