

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

**«РеалБест ДНК *Bordetella species*/*Bordetella pertussis*/*Bordetella bronchiseptica*»
(комплект 1)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Bordetella species*/*Bordetella pertussis*/*Bordetella bronchiseptica*» предназначен для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* в клинических образцах и бактериальных культурах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических образцов (мазки со слизистой носоглотки и задней стенки ротоглотки) и бактериальных культур проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» и «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор» (возможно использование других наборов, разрешенных в установленном порядке к обращению в РФ, предназначенных для выделения ДНК из указанных образцов).

Комплект 1 применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96», «iQ5 iCycler» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами, зарегистрированными в установленном порядке на территории РФ.

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

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК 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 Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителей инфекции из клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) <i>Лиофилизированная</i>	48 пробирок
Оптическая пленка	1 лист

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Bordetella species*, ДНК *Bordetella pertussis* и ДНК *Bordetella bronchiseptica* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия (СОП 05-2-782), с содержанием ДНК *Bordetella species*, ДНК *Bordetella pertussis* и ДНК *Bordetella bronchiseptica* по 100 копий в пробе.

3.2. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Bordetella species*: клинические испытания, проведенные на 93 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 96,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Bordetella pertussis*: клинические испытания, проведенные на 40 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 92,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Bordetella bronchiseptica*: клинические испытания, проведенные на 40 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 92,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

3.3. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Bordetella species*: клинические испытания, проведенные на 46 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 93,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Bordetella pertussis*: клинические испытания, проведенные на 99 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Bordetella bronchiseptica*: клинические испытания, проведенные на 99 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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. ПКО содержит натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

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

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

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

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

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

4.9. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.10. 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»).

4.11. 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 (с каналами детекции «Сy5», «HEX», «ROX», «FAM»):

«CFX96», «iQ5 iCycler» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналоги, зарегистрированные в установленном порядке на территории РФ;

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

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

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», 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);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барье-

пом (например, фирма «Corning Incorporated-Life Sciences», США);

- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, SSI, США);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- нож канцелярский или ножницы.

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» и МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша».

Для анализа используется ДНК, выделенная из клинических образцов (мазки со слизистой носоглотки и задней стенки ротоглотки) и бактериальных культур с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор» согласно инструкции по применению соответствующего набора (возможно использование других наборов, разрешенных в установленном порядке к обращению в РФ, предназначенных для выделения ДНК из указанных образцов).

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО, который является компонентом данного набора, и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения.

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

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

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

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более

3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (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 для каждого образца индивидуальный 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 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

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

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

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

«Cy5» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«HEX» – для регистрации сигнала ДНК *Bordetella species*;

«ROX» – для регистрации сигнала ДНК *Bordetella pertussis*;

«FAM» – для регистрации сигнала ДНК *Bordetella bronchiseptica*.

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 «Cy5») и определять значение порогового цикла Ct ВКО;

– нарастание сигнала амплификации ДНК *Bordetella species* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

– нарастание сигнала амплификации ДНК *Bordetella pertussis* (канал «ROX») и опре-

делять значение порогового цикла Ct ПКО;

– нарастание сигнала амплификации ДНК *Bordetella bronchiseptica* (канал «FAM») и определять значение порогового цикла Ct ПКО.

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «HEX», «ROX» и «FAM».

Если для ОКО значение Ct по каналу «HEX» и/или по каналу «ROX», и/или по каналу «FAM» 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 «Cy5») и определять Ct ВКО.

8.2. Учёт результатов.

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

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение Ct по каналам «HEX», «ROX» и «FAM» больше 40 или не определяется.

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

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

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

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Bordetella bronchiseptica*, если для этого образца значение Ct по каналу «FAM» 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 26 °С не более 10 суток.

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

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

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение 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 Bordetella species/Bordetella pertussis/Bordetella bronchiseptica», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

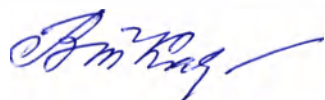
тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор

М.П.



Т.И. Поспелова



Протипуrowано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.
Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Л.Н. Захарова
"25" 06 2019 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

«25» 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК *Bordetella species*
с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

**«РеалБест ДНК *Bordetella species*/*Bordetella pertussis*/*Bordetella bronchiseptica*»
(комплект 2)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК *Bordetella species*/*Bordetella pertussis*/*Bordetella bronchiseptica*» предназначен для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* в клинических образцах и бактериальных культурах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических образцов (мазки со слизистой носоглотки и задней стенки ротоглотки) и бактериальных культур проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» и «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор» (возможно использование других наборов, разрешенных в установленном порядке к обращению в РФ, предназначенных для выделения ДНК из указанных образцов).

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

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

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК 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 Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	1 пробирка, 1 мл
Реакционная смесь для ПЦР (РС) <i>Лиофилизированная</i>	5 пробирок, каждая на 10 определений
Раствор для восстановления (РВ) <i>Бесцветная жидкость</i>	1 флакон, 2 мл

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Bordetella species*, ДНК *Bordetella pertussis* и ДНК *Bordetella bronchiseptica* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандарт-

ного образца предприятия (СОП 05-2-782), с содержанием ДНК *Bordetella species*, ДНК *Bordetella pertussis* и ДНК *Bordetella bronchiseptica* по 100 копий в пробе.

3.2. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Bordetella species*: клинические испытания, проведенные на 93 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 96,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Bordetella pertussis*: клинические испытания, проведенные на 40 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 92,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Bordetella bronchiseptica*: клинические испытания, проведенные на 40 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 92,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

3.3. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Bordetella species*: клинические испытания, проведенные на 46 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 93,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Bordetella pertussis*: клинические испытания, проведенные на 99 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

Диагностическая специфичность выявления ДНК *Bordetella bronchiseptica*: клинические испытания, проведенные на 99 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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. ПКО содержит натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

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

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

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

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

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

4.9. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДПП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.10. 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»).

4.11. 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 (с каналами детекции «Cy5»/«Red», «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange» и «FAM»/«Green») ротаторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия) или планшетного типа: «CFX96», «iQ5 iCycler» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналоги, зарегистрированные в установленном порядке на территории РФ;

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

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

– микроцентрифуга для пробирок вместимостью 2 мл, обеспечивающая 13000 об/мин (например, «Eppendorf MiniSpin», 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);

- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, фирма «Corning Incorporated-Life Sciences», США);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (например, фирма «Corning Incorporated-Life Sciences», 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» и МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша».

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинических образцов (мазки со слизистой носоглотки и задней стенки ротоглотки) и бактериальных культур с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор» согласно инструкции по применению соответствующего набора (возможно использование других наборов, разрешенных в установленном порядке к обращению в РФ, предназначенных для выделения ДНК из указанных образцов).

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО, который является компонентом данного набора, и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения.

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

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку, отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с РС и выдержать их при температуре (18-26) °С не менее 30 минут.

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 определений.

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

После первого вскрытия упаковки РС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

6.2.2. В пробирку с РС добавить 300 мкл РВ, аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при температуре (18-26) °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

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

Восстановленную РС использовать в день проведения анализа.

6.2.3. ПКО после вскрытия пробирки 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 контрольные образцы).

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

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

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

7.3. В каждую пробирку внести по 25 мкл 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.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

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

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

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 для всех приборов проводить при 60 °С.

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

«Cy5» (для приборов «CFX96», «iQ5 iCycler», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Red» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«HEX» (для приборов «CFX96», «iQ5 iCycler», «ДТ-96»), «JOE» (для прибора «Rotor-Gene 3000»), «Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК *Bordetella species*;

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

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

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

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5»/«Red») и определять значение порогового цикла Ct ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Bordetella species* (канал «HEX»/«JOE»/«Yellow») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Bordetella pertussis* (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Bordetella bronchiseptica* (канал «FAM»/«Green») и определять значение порогового цикла Ct ПКО.

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5»/«Red») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange» и по каналу «FAM»/«Green».

Если для ОКО значение Ct по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» и/или по каналу «ROX»/«Orange», и/или по каналу «FAM»/«Green» 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 «Cy5»/«Red») и определять Ct ВКО.

8.2. Учёт результатов.

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

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение Ct по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange» и «FAM»/«Green» больше 40 или не определяется.

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

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

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Bordetella pertussis*, если для этого образца значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40.

Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Bordetella bronchiseptica*, если для этого образца значение Ct по каналу «FAM»/«Green» 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 Bordetella species/Bordetella pertussis/Bordetella bronchiseptica», 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
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор



Т.И. Поспелова

м.п.



Пропиновано, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.
Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н.
"05" 06 2019 г.





«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
М.Д. Хусаинов
«18» _____ 2019 г.

Образцы маркировки на Набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени “РеалБест ДНК *Bordetella species*/*Bordetella pertussis*/*Bordetella bronchiseptica*”

1. Образцы этикеток на компоненты набора
“РеалБест ДНК *Bordetella species*/*Bordetella pertussis*/*Bordetella bronchiseptica*”
(Комплект 1)

Наименование компонента	Этикетка
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС)	
Положительный контрольный образец (ПКО)	

2. Образцы этикеток на коробке набора
“РеалБест ДНК *Bordetella species*/*Bordetella pertussis*/*Bordetella bronchiseptica*”
(Комплект 1)

2.1. Верхняя этикетка.

REF D-XXXX	
Набор реагентов для выявления ДНК <i>Bordetella species</i> с дифференциацией видов <i>Bordetella pertussis</i> и <i>Bordetella bronchiseptica</i> методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени	
РеалБест ДНК <i>Bordetella species</i>/<i>Bordetella pertussis</i>/<i>Bordetella bronchiseptica</i> (комплект 1)	
состав:	
1. Положительный контрольный образец	1 пр. 1 мл
2. Готовая реакционная смесь для ПЦР	48 пр.
3. Оптическая пленка	1 лист
ТУ 21.20.23-039-23548172-2018 РУ	

2.2. Боковая этикетка №1.

REF D-XXXX	LOT XXXX
2°C 8°C IVD Σ 48	XXXX-XX-XX XXXX-XX-XX
РеалБест ДНК <i>Bordetella species</i>/<i>Bordetella pertussis</i>/<i>Bordetella bronchiseptica</i> (комплект 1)	
	XXXXXXXXXXXXXXXXXX

2.3. Боковая этикетка №2.

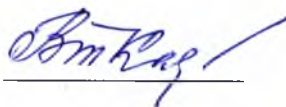
АО «Вектор-Бест»

Россия, 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
Научно-производственная зона, корпус 36, комната 211,
тел./факс: (383) 332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
www. vector-best.ru

Примечание. Текст боковой этикетки №2 может быть нанесен непосредственно на коробку типографским способом

«СОГЛАСОВАНО»

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

«18» июня 201 9 г.

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 2 листов.

Директор по технологии и качеству
АО «Вектор-Бест»



Масяго А.В.

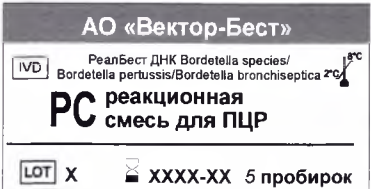
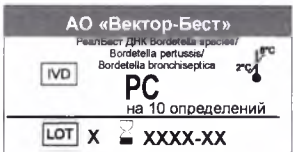
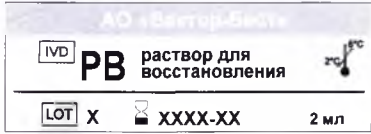
2019 г.



«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
М.Д. Хусаинов
« 18 » _____ 2019 г.

Образцы маркировки на Набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени “РеалБест ДНК *Bordetella species*/*Bordetella pertussis*/*Bordetella bronchiseptica*”

**1. Образцы этикеток на компоненты набора “РеалБест ДНК *Bordetella species*/*Bordetella pertussis*/*Bordetella bronchiseptica*”
(Комплект 2)**

Наименование компонента	Этикетка
Реакционная смесь для ПЦР (РС)	  а) Пакет с РС б) Пробирки с РС
Положительный контрольный образец (ПКО)	
Раствор для восстановления (РВ)	

**2. Образцы этикеток на коробке набора
“РеалБест ДНК *Bordetella species*/*Bordetella pertussis*/*Bordetella bronchiseptica*”
(Комплект 2)**

2.1. Верхняя этикетка.

REF

D-XXXX

Набор реагентов для выявления ДНК *Bordetella species* с дифференциацией видов *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

РеалБест ДНК *Bordetella species*/
Bordetella pertussis/*Bordetella bronchiseptica*
(комплект 2)

состав:
1. Положительный контрольный образец 1 пр. 1 мл
2. Реакционная смесь для ПЦР 5 пр.
3. Раствор для восстановления 1 фл. 2 мл

ТУ 21.20.23-039-23548172-2018
РУ

2.2. Боковая этикетка №1.

REF D-XXXX

LOT XXXX

2°C 8°C IVD Σ 50

XXXX-XX-XX
XXXX-XX-XX

РеалБест ДНК *Bordetella species*/
Bordetella pertussis/
Bordetella bronchiseptica
(комплект 2)



2.3. Боковая этикетка №2.

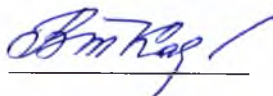
АО «Вектор-Бест»

Россия, 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
Научно-производственная зона, корпус 36, комната 211,
тел./факс: (383) 332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
www. vector-best.ru

Примечание. Текст боковой этикетки №2 может быть нанесен непосредственно на коробку типографским способом

«СОГЛАСОВАНО»

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

«18» июня 2019 г.

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 2 листов.

Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"

Масяго А.В. Масяго А.В.
"18" нояб 2019 г.