

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ПОЛИКЛИНИКА № 1» УПРАВЛЕНИЯ ДЕЛАМИ
ПРЕЗИДЕНТА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

119002 г. Москва, переулок Сивцев-Вражек, дом 26/28, тел./факс (499)241-12-62

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный врач Федерального
Государственного бюджетного учреждения
«Поликлиника № 1» Управления делами
Президента Российской Федерации

Е.В. Ржевская

2018 г.



**оценки результатов клинических испытаний медицинского изделия для
диагностики in vitro**

№ 11 от 05 марта 2018 г.

Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL
по ТУ 21.20.23.110-279-01897593-2017

Составлен: Федеральным Государственным бюджетным учреждением
«Поликлиника № 1» Управления делами Президента Российской Федерации, 119002 г.
Москва, переулок Сивцев-Вражек, дом 26/28.

Испытательная лаборатория (центр): ФГБУ «Поликлиника № 1» Управления делами
Президента Российской Федерации, 119002 г. Москва, переулок Сивцев-Вражек, дом
26/28, тел (495) 620-81-01

Полномочия на проведение работ по испытаниям:

Лицензия на осуществление медицинской деятельности от 30 апреля 2014 г. № ФС-
99-01-008836 сроком действия – бессрочно.

Письмо Росздравнадзора № 01-5588/14 от 26.03.2014 года «О включении в Перечень
Медицинских организаций, проводящих клинические испытания медицинских изделий».

Приказ Росздравнадзора № 1971 от 26.03.2014 года.

В период с 07 сентября 2017 г. по 05 марта 2018 г. сотрудниками испытательной
лаборатории ФГБУ «Поликлиника № 1» Управления Делами Президента Российской
Федерации была проведена оценка результатов клинических испытаний набора реагентов

для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия (далее – испытуемый набор, набор реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL) в соответствии с ТУ 21.20.23.110-279-01897593-2017 и инструкцией по применению.

2. Для проведения клинических испытаний были предъявлены:

2.1. Документы:

- 2.1.1. Письмо-обращение о проведении клинических испытаний от 07.09.2017 г.;
- 2.1.2. Разрешение Росздравнадзора на проведение клинических испытаний набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL № 638/2017 от 28.08.2017 (копия);
- 2.1.3. Программа клинических испытаний, утвержденная 07 сентября 2017 г.;
- 2.1.4. Заявление на регистрацию;
- 2.1.5. Технические условия (ТУ 21.20.23.110-279-01897593-2017) испытуемого набора;
- 2.1.6. Инструкция по применению испытуемого набора;
- 2.1.7. Акт оценки результатов технических испытаний набора № 99/2017-01 ПМИ от 12 апреля 2017 г. с приложениями;
- 2.1.8. Дополнение к Акту оценки результатов технических испытаний медицинского изделия для диагностики in vitro № 99/2017-01 ПМИ от 12 апреля 2017 г., программе и методике проведения технических испытаний № 99/2017-01 ПМИ и протоколу технических испытаний № 99/2017-01 ПТИ от 12 апреля 2017 г.;
- 2.1.9. Сведения о нормативной документации;
- 2.1.10. Лабораторно-экспериментальный отчет о разработке набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL;
- 2.1.11. Данные по стабильности испытуемого набора (протокол оценки стабильности набора реагентов, отчет (промежуточный/ окончательный) о проведении проверки стабильности набора реагентов);
- 2.1.12. Фотографии испытуемого набора;
- 2.1.13. Паспорт качества на испытуемый набор формы комплектации 1 (серия 13.03.17, срок годности до 13.03.18);
- 2.1.14. Паспорт качества на испытуемый набор формы комплектации 2 (серия 13.03.17, срок годности до 13.03.18);
- 2.1.15. Вкладыши к испытуемым наборам;
- 2.1.16. Краткое руководство на набор реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL;

- 2.1.17. Регистрационное удостоверение к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» № ФСР 2008/03147 от 24 марта 2017 (далее – комплект реагентов «РИБО-преп»);
- 2.1.18. Инструкция по применению комплекта реагентов «РИБО-преп»;
- 2.1.19. Паспорт комплекта реагентов «РИБО-преп» формы комплектации 2 серии 03.09.17 срок годности до 03.06.18;
- 2.1.20. Регистрационное удостоверение к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «МАГНО-сорб» № ФСР 2010/07265 от 05.05.2012 г. (далее – комплект реагентов «МАГНО-сорб»);
- 2.1.21. Инструкция по применению комплекта реагентов «МАГНО-сорб»;
- 2.1.22. Паспорт на комплект реагентов «МАГНО-сорб» форма комплектации 2, серия 27.02.17 срок годности до 27.05.18;
- 2.1.23. Паспорт штамма микроорганизма *Borrelia miyamotoi* Izh-4;
- 2.1.24. Справка о депонировании авторского штамма микроорганизма *Borrelia miyamotoi* Izh-4 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk»;
- 2.1.25. Инструкция по применению набора реагентов для выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*) производства АО «Вектор-Бест», Россия (далее – набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*», набор сравнения);
- 2.1.26. Паспорт на набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*» (АО «Вектор-Бест», Россия) комплект 2, серия 12, срок годности до 17.04.2018 г.
- 2.1.27. Регистрационное удостоверение на набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*» № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 г. (копия);
- 2.2. Следующие образцы медицинских изделий:
- 2.2.1. Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) формы комплектации 1 серии 13.03.17, срок годности до 13.03.2018 – 14 наборов;
- 2.2.2. Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) форма комплектации 2 серии 13.03.17, срок годности до 13.03.2018 – 14 наборов;
- 2.2.3. Набор реагентов для выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*) (АО «Вектор-Бест», Россия) комплект 2, серия 12, срок годности до 17.04.2018 – 14 шт.;

- 2.2.4. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» форма комплектации 2 (серия 03.09.17 срок годности до 03.06.18) – 7 шт.;
- 2.2.5. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «МАГНО-сорб» форма комплектации 2, серия 27.02.17, срок годности до 27.05.18 (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07265 от 05.05.2012 г.) – 1 шт.;
- 2.2.6. Инактивированный штамм *Borrelia miyamotoi* IzH-4 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk», регистрационный номер: В-8324 – 1 шт.

Предоставление испытуемого набора реагентов и дополнительных изделий обеспечивает ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

3. Сотрудники испытательной лаборатории ФГБУ «Поликлиника № 1» Управления Делами Президента Российской Федерации провели оценку результатов клинических испытаний набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия в соответствии с утвержденной программой от 07.09.2017 г.

3.1. Краткая характеристика набора реагентов, его назначение. Набор реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL предназначен для качественного определения ДНК *Borrelia miyamotoi* в биологическом материале (кровь, тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал, ликвор, клещи) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала.

3.2. Вид медицинского изделия в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий – 342640.

3.3. Класс риска – 2б.

3.4. Представленная документация (п.2.1.) достаточна для проведения клинических испытаний. Согласована программа клинических испытаний от 07.09.17. Технические условия на испытуемый набор содержат всю необходимую информацию о наборе реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL (описание, назначение, технические требования, требования безопасности, требования охраны окружающей среды, правила приемки, методы контроля, транспортирование и хранение, указания по эксплуатации, гарантии изготовителя и т.д.); лабораторно-экспериментальный отчет

содержит достаточную информацию о разработке и испытаниях набора. Представлены и зачтены данные по стабильности испытуемого набора (протокол оценки стабильности набора реагентов, отчет (промежуточный/ окончательный) о проведении проверки стабильности набора реагентов), необходимые документы на набор сравнения и комплекты реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала. Инструкция к испытуемому набору написана доступным языком, удобна для потребителей, порядок проведения исследования изложен четко. Экспериментальная апробация инструкции по применению испытуемого набора реагентов проведена успешно, по результатам клинических испытаний исправлен раздел «Диагностические характеристики».

3.5. Используемый в клинических испытаниях биологический материал:

- кровь от 131 пациента с лихорадочным заболеванием, возникшим после присасывания клеща, собранная на базе Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга;
- 50 образцов ликвора от пациентов инфекционных больниц № 1 и № 2 г. Москвы (далее - ИКБ № 1 и ИКБ № 2) с менингитами иной этиологии;
- 50 образцов аутопсийного материала от умерших пациентов с иной этиологией заболевания из клинических стационаров (ИКБ № 1 и ИКБ № 2) г. Москвы;
- 200 клещей *I. ricinus*, собранных в Москве и Московской области в 2017 году;
- 50 образцов крови, взятой в межэпидемический период по иксодовым клещевым инфекциям от пациентов инфекционных больниц № 1 и № 2 г. Москвы с заболеваниями иной этиологии.
- искусственно контаминированные штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» отрицательные образцы ликвора, аутопсийного материала и клещей (по 20 модельных образцов каждого вида биологического материала).

3.6. Результаты проведенных клинических испытаний.

Каждый образец заявленного биологического материала исследовался трижды: а) испытуемым набором формы комплектации 1; б) испытуемым набором формы комплектации 2; в) набором сравнения «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*», РУ № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 г., производства АО «Вектор-Бест».

Таблица 1. Результаты анализа образцов крови от больных с подозрением на заболевание, вызванное *B.miyamotoi*

Тип образцов, анализируемых испытуемым набором	Результаты исследования набором реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi-FL</i>		Результаты исследования набором реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> » (АО «Вектор-Бест», Россия)	
			положительных	отрицательных
Кровь	Всего исследовано 131 образец	положительных	40	1
		отрицательных	0	90

Таблица 2. Результаты анализа образцов клещей, собранных в Москве и Московской области

Тип образцов, анализируемых испытуемым набором	Результаты исследования набором реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi-FL</i>		Результаты исследования набором реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> » (АО «Вектор-Бест», Россия)	
			положительных	отрицательных
Клещи	Всего исследовано 200 образца	положительных	6	0
		отрицательных	0	194

Таблица 3. Результаты анализа отрицательных проб крови, ликвора, аутопсийного материала, клещей

Тип образцов	Результаты исследования набором реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi-FL</i>		Результаты исследования набором реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> » (АО «Вектор-Бест», Россия)	
			положительных	отрицательных
Кровь	Всего исследовано 141 образец	положительных	0	1
		отрицательных	0	140
Ликвор	Всего исследовано 50 образцов	положительных	0	0
		отрицательных	0	50
Аутопсийный материал	Всего исследовано 50 образцов	положительных	0	0
		отрицательных	0	50
Клещи	Всего исследовано 194 образца	положительных	0	0
		отрицательных	0	194

Таблица 4. Проанализированные модельные образцы ликвора, аутопсийного материала, клещей, контаминированные штаммом *B.miyamotoi* Izh-4 в конечной концентрации 10^3 копий/мл

Вид материала	Объем исследуемой пробы, мкл	Концентрация ДНК <i>B.miyamotoi</i> Izh-4 в образце, копий/мл	Комплект реагентов для экстракции ДНК	Число контаминированных образцов
Аутопсийный материал	100	1×10^3	«РИБО-преп»	20
Ликвор	100	1×10^3	«РИБО-преп»	20
Клещи	100	1×10^3	«РИБО-преп»	20
	100	1×10^3	«МАГНО-сорб»	20
Всего исследовано модельных проб				80

Каждая проба была амплифицирована с использованием испытуемого набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL в двух формах комплектации и с использованием препарата сравнения – набора реагентов для выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*) производства АО «Вектор-Бест», Россия.

По всем проанализированным пробам биологического материала и модельных образцов результаты исследования двумя формами комплектации испытуемого набора совпали. Диагностические характеристики (чувствительность и специфичность), полученные в результате клинико-лабораторных испытаний указаны в Таблице 5.

Расчеты диагностических характеристик приведены в пункте 9 протокола клинических испытаний, в соответствии с программой клинических испытаний набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL.

Таблица 5. Итоговая таблица диагностических характеристик набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL

Тип образцов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность, (с доверительной вероятностью-95 %)
Кровь	91,2-100,0 %	94,0-99,8 %
Клещи	87,1-100,0 %	98,1-100,0 %
Ликвор	83,9-100,0 %	92,9-100,0 %
Аутопсийный материал	83,9-100,0 %	92,9-100,0 %

В общей сложности в ходе клинико-лабораторных испытаний проанализирована 561 проба биологического материала, из них 131 проба крови от пациентов Ижевской

областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга с подозрением на заболевание, вызванное *B. miyamotoi*; 50 контрольных образцов крови, 50 образцов ликвора, 50 образцов аутопсийного материала от пациентов ИКБ №№ 1 и 2, 200 образцов клещей *I. ricinus*; 80 модельных проб (ликвора, аутопсийного материала и клещей), контаминированных штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» в концентрации 10^3 копий/мл.

3.7. Сведения о функциональных характеристиках медицинского изделия, применявшегося как препарат сравнения.

В качестве набора сравнения использовался **единственный** зарегистрированный в Российской Федерации ПЦР-набор, выявляющий ДНК заявленного микроорганизма: набор реагентов для выявления ДНК *B. miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*), РУ № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 г., производства АО «Вектор-Бест», Россия. Аналитическая чувствительность набора сравнения - 100 копий ДНК *Borrelia miyamotoi* в 100 мкл стандартного образца предприятия в 100 % случаев.

3.8. Функциональные качества медицинского изделия, эффективность его применения. Показания и противопоказания к применению.

Аналитическая чувствительность испытуемого набора.

Набор реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL воспроизводимо обнаруживает ДНК *Borrelia miyamotoi*-FL в концентрации 1×10^3 копий/мл в образцах крови, тканевого (аутопсийного, биопсийного) материала, ликвора, клещей при экстракции из 100 мкл пробы с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» и в концентрации 1×10^3 копий/мл при выделении из 100 мкл суспензии клещей при использовании комплекта реагентов «МАГНО-сорб» в 100 % случаев.

Аналитическая специфичность испытуемого набора.

Изучение аналитических характеристик было проведено на этапе технических испытаний медицинского изделия в ФГБУЗ ГЦГиЭ ФМБА России.

Набор реагентов не дает перекрестных реакций при исследовании следующих микроорганизмов: *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *Leptospira interrogans*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella quantana*, *B. henselae*, *Rickettsia conorii*, *R. sibirica*, *Babesia microti*, *Treponema pallidum*, а также геномной ДНК человека, ДНК клещей и ДНК грызунов. Результаты испытаний приведены в Дополнении к Акту

оценки результатов технических испытаний медицинского изделия для диагностики *in vitro* № 99/2017-01 ПМИ от 12 апреля 2017 г., программе и методике проведения технических испытаний № 99/2017-01 ПМИ и протоколу технических испытаний № 99/2017-01 ПТИ от 12 апреля 2017 г.

Противопоказаний к применению и побочных действий не имеется.

3.9. Эксплуатационные качества медицинского изделия, возможности управления и удобство обращения с ним, техническая эстетика медицинского изделия, его оформление, стабильность изделия при эксплуатации в условиях практической лаборатории.

В клинических испытаниях все испытываемые наборы реагентов показали надёжность и удобство обращения в условиях практической лаборатории. Внутренняя упаковка испытываемого набора представлена пластиковыми пробирками. Внешняя упаковка набора реагентов представлена коробкой из картона, удобно открывается и, при этом, надёжно сохраняет реагенты при хранении. Маркировка всего набора и отдельных реагентов понятна и удобна для пользователя. Стабильность набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi-FL* в условиях гарантированного срока хранения (12 мес.) подтверждена представленными и зачтенными данными по проверке стабильности испытываемого набора (протокол оценки стабильности набора реагентов, отчет (промежуточный/ окончательный) о проведении проверки стабильности набора реагентов).

Экспериментальная апробация инструкции по применению набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi-FL* проведена успешно. Недостатки в работе испытываемого набора не выявлены.

3.10. В результате проведенных испытаний были уточнены диагностические характеристики испытываемого набора АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi-FL*. Уточнённые диагностические характеристики (диагностическую чувствительность и диагностическую специфичность) (см. таблицу 5) рекомендовано внести в инструкцию по применению испытываемого набора.

4. Краткое изложение результатов испытаний.

Анализ данных, полученных в процессе проведения клинических испытаний на образцах биологического материала от пациентов с лихорадочным заболеванием, возникшим после присасывания клещей из Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга (образцы крови), от пациентов инфекционных больниц № 1 и № 2 (ИКБ № 1 и ИКБ № 2) г. Москвы с менингитами

иной этиологии (образцы ликвора), от умерших пациентов с иной этиологией заболевания из ИКБ № 1 и ИКБ № 2 г. Москвы (образцы аутопсийного материала); на образцах клещей *I. ricinus*, собранных в Москве и Московской области в 2017 году; на образцах крови, взятой в межэпидемический период по иксодовым клещевым инфекциям от пациентов ИКБ № 1 и ИКБ № 2 г. Москвы с заболеваниями иной этиологии; на искусственно контаминированных штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» отрицательных образцах ликвора, аутопсийного материала и клещей показал, что подтверждено соответствие показателей качества, указанных в его эксплуатационной, технической и нормативной документации; определены диагностические характеристики (чувствительность и специфичность) на заявленном биологическом материале.

Идентификация представленных двух форм комплектации набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL прошла успешно. Комплектность, упаковка и маркировка испытуемого набора представленных двух форм комплектации соответствует указанному в ТУ 21.20.23.110-279-01897593-2017, в паспортах качества, вкладышах, в кратком руководстве, инструкции по применению, представленных фотографиях, свидетельстве о нормативной документации.

5. Выводы по результатам испытаний.

Медицинское изделие – Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL, представленное на клинические испытания, является качественным, эффективным и безопасным диагностическим МИ с достаточными диагностическими чувствительностью и специфичностью, соответствует предназначенному производителем применению и предлагаемым им методам использования, что позволяет рекомендовать его использование в клинической лабораторной диагностике для выявления и идентификации ДНК *B. miyamotoi* и решения эпидемиологических задач по выявлению случаев этой инфекции в РФ.

6. Оценка результатов клинических испытаний.

Испытания проведены в полном объеме на всех видах заявленного в инструкции по применению набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL биологического материала. Достоверность исследования доказана достаточно значимыми диагностическими чувствительностью и специфичностью. Все испытуемые образцы набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL клинические испытания выдержали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL по ТУ 21.20.23.110-279-01897593-2017, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора СООТВЕТСТВУЕТ требованиям нормативной, технической и эксплуатационной документации производителя.

Приложения являются неотъемлемой частью Акта.

Приложения:

- а) утвержденная программа клинических испытаний;
- б) протокол клинических испытаний;
- в) инструкция по применению набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL.

Главный исследователь:

Начальник организационно-методического
отдела ФГБУ «Поликлиника № 1»

 д.м.н., проф. В.В. Книга

Исследователь:

Заведующий клинико-диагностической
лабораторией с испытательным центром
медицинской продукции

 к.м.н. Н.Б. Кухтина

Заместитель директора Федерального
бюджетного учреждения науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»
Роспотребнадзора

В.В. Малеев

«07» сентября 2017 г.

Главный врач Федерального
Государственного бюджетного учреждения
«Поликлиника № 1» Управления делами
Президента Российской Федерации

Е.В. Ржевская

Б
« 07 » сентября 2017 г.

2017 г.

клинических испытаний набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс®

***Borrelia miyamotoi*-FL no TY 21.20.23.110-279-01897593-2017,**

производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Микроорганизмы рода *Borrelia* относятся к порядку *Spirochaetales*, семейству *Spirochaetaceae*. Свое родовое название они получили в честь французского микробиолога А. Borrel, описавшего эту разновидность спирохет. Все известные виды рода *Borrelia* морфологически весьма сходны: грамотрицательные спирохеты, относительно легко окрашивающиеся анилиновыми красителями, что отличает их от других родов спирохет. Длина микробной клетки - от 10 до 30 мкм, поперечный размер составляет 0,2-0,5 мкм. По форме представляют собой извитую, лево- или правовращающуюся спираль.

Боррелии подразделяются на несколько подгрупп, среди них выделяют:

- возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), входящих в комплекс *B.burgdorferi* sensu lato: *B.burgdorferi* sensu stricto, *B.garinii*, *B.afzelii*, *B.lusitaniae*, *B.valaisiana*, *B.andersonii*, *B.bissettii*, *B.japonica*, *B.tanukii*, *B.turdi*, *B.sinica*, *B.spielmanii*;
- возбудителя возвратного иксодового клещевого боррелиоза: *B.miyamotoi*;
- возбудителей возвратной клещевой лихорадки, или аргасовых клещевых боррелиозов (АКБ): *B.duttoni*, *B.parkeri*, *B.turicatae*, *B.hermsii* и др.;
- возбудителя возвратного тифа: *B.recurrentis*.

Спирохета *Borrelia miyamotoi* впервые была обнаружена в Японии в 1995 году в клещах *I.persulcatus*, и в настоящее время известно, что ДНК этой бактерии обнаруживается в клещах *I.ricinus*, *I.persulcatus*, *I.scapularis*, *I.pacificus*, *I.dentatus*, причем

обнаружена генетическая дифференциация изолятов *B.miyamotoi* в зависимости от вида переносчика. *B.miyamotoi* встречается в 5-10 % иксодовых клещей в Европе, США, Японии. В России эндемичными районами по *B.miyamotoi* считаются Свердловская область и Удмуртия. Уровень зараженности клещей *I.persulcatus*, собранных в северо-западном регионе (Московская, Ярославская, Костромская, Липецкая, Вологодская области), Поволжье (Удмуртия, Кировская область), на юге России (Ставропольский край), Урале (Свердловская, Челябинская, Курганская области) и в Сибири (Новосибирская и Иркутская области) составил в среднем 2,7 % (от 1,9 % для центральных областей до 5,7 % в Поволжье). В Московской, Липецкой областях и Ставропольском крае *B.miyamotoi* была обнаружена в 1,2 % клещей *I.ricinus*. В 2003 году *B.miyamotoi* была обнаружена в крови людей, заболевших после присасывания клеща в Удмуртии, в 2012 году инфицирование людей подтверждено в США, позже в Нидерландах, Японии.

Инкубационный период при боррелиозе, вызванном *B.miyamotoi*, составляет в среднем 14 дней (в отличие от эритемной формы ИКБ, при которой мигрирующая эритема появляется в среднем через 7-8 дней после присасывания клеща). Заболевание начинается с подъема температуры выше 38 °С, слабости, озноба, потливости, сильной головной боли. Как правило, лихорадочный период продолжается 3-4 дня (от 2 до 6 дней). Но в отсутствие адекватной антибиотикотерапии возможен повторный лихорадочный приступ в среднем через 11 дней (13 % случаев), крайне редко наблюдались три волны лихорадки у пациентов, инфицированных *B.miyamotoi*. Рецидивы никогда не наступали после курса антибактериальной терапии. В ряде случаев отмечено, что в патологический процесс вовлекаются внутренние органы, и лихорадка осложняется гепатитом, миокардитом, пневмонией, нефропатией, явлениями менингизма, подтверждаемыми клиническими наблюдениями, инструментально и лабораторными исследованиями. Данная патология со стороны внутренних органов скорее всего связана с нарушениями в системе гемостаза: развитием коагулопатии. При исследовании ликвора (при явлениях менингизма) методом ПЦР ДНК *B.miyamotoi* в исследуемых биологических жидкостях не обнаружена. Опубликованы данные о развитии менингоэнцефалита, связанного с *Borrelia miyamotoi*, у пациентки с хроническим заболеванием (неходжкинская лимфома) (Gugliotta JL, Goethert HK, Berardi VP, et al. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. N Engl J Med 2013; 368: 240-245). Для доказательства того, что боррелиоз, вызванный *B.miyamotoi*, не протекает в эритемной форме, требуются дальнейшие исследования биопсийного материала.

В ряде случаев ДНК *B.miyamotoi* детектируется в крови пациентов с мигрирующей эритемой (2-8 % пациентов), вероятно, здесь можно предположить микст-инфекцию,

вызванную как минимум двумя разными боррелиями, и такое предположение подтверждается при изоляции из крови одновременно ДНК *B.miyamotoi* и *B.garinii*. В то же самое время при исследовании образцов капиллярной крови, взятой из периферийного участка МЭ у 37 пациентов, ДНК боррелий была обнаружена у 17 человек, и в 100 % случаев относилась к комплексу *B.burgdorferi* sl.

В лабораторной диагностике боррелиоза, вызванного *B.miyamotoi*, метод ПЦР играет в настоящее время ведущую роль, так как в среднем концентрация ДНК *B.miyamotoi* в крови в первые дни болезни находятся в диапазоне 10^4 – 10^5 копий/мл. При использовании ПЦР ДНК *B.miyamotoi* выявляют ежегодно примерно при 40-50 % ИКБ, протекающих в безэритемной форме, причем в 87 % случаев *B.miyamotoi* обнаруживали в крови, взятой в первые пять дней заболевания, и только в 13 % случаев - взятой позже. Период обнаружения ДНК *B.miyamotoi* в крови редко длится дольше лихорадочного периода, продолжающегося, как уже описано выше, 3-4 дня. Для профилактики возникновения боррелиоза, вызванного *B.miyamotoi*, в случае присасывания инфицированного иксодового клеща, исследуется на наличие ДНК *B.miyamotoi* снятый с пациента клещ.

Получено разрешение Росздравнадзора № 638/2017 от 28 августа 2017 г. на проведение клинических испытаний медицинского изделия – Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия.

2. Цель испытаний

2.1. Проверка соответствия испытываемого набора АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL указанной нормативной документации, технической и эксплуатационной документации производителя.

2.2. Проверка соответствия испытываемого набора АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL предназначенному производителем назначению и предлагаемым им методам использования.

2.3. Экспериментальная апробация инструкции по применению испытываемого набора АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL.

2.4. Проверка полноты и достоверности установленных технической и эксплуатационной документацией производителя заявленных характеристик безопасности и эффективности испытываемого набора АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL в соответствии с предназначенным производителем применением медицинского изделия по назначению, в том числе определение его диагностических характеристик, указанных в технической и эксплуатационной документации производителя.

2.5. Изучение качества испытуемого набора, эффективности и безопасности его применения.

2.6. Оценка возможности применения данного медицинского изделия в практике медицинских учреждений Российской Федерации.

3. Характеристика испытуемого набора

3.1. Объектом испытаний являются образцы медицинского изделия - набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL по ТУ 21.20.23.110-279-01897593-2017, производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия.

Набор реагентов предназначен для качественного определения ДНК *Borrelia miyamotoi* в биологическом материале (кровь, тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал, ликвор, клещи) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике.

Набор реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN

Состав комплекта:

- ПЦР-смесь-FL *Borrelia miyamotoi* - 1 пробирка;
- ПЦР-буфер-Н - 1 пробирка;
- К+ *Borrelia miyamotoi* - 1 пробирка;
- К- - 1 пробирка;
- ВКО-FL - 1 пробирка;
- ОКО - 1 пробирка.

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Состав комплекта:

- ПЦР-смесь *Borrelia miyamotoi*-Lyo - 48 пробирок;
- К+ *Borrelia miyamotoi* - 1 пробирка;
- К- - 1 пробирка;
- ВКО-FL - 1 пробирка;
- ОКО - 1 пробирка.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования

необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК: «РИБО-преп» (РУ ФСР 2008/03147), и «МАГНО-сорб» (РУ ФСР 2010/07265). Форма комплектации 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма комплектации 2 рассчитана на проведение 48 реакций амплификации, включая контроли.

По показателям качества испытуемый набор должен соответствовать характеристикам и нормам, заявленным в техническо-эксплуатационной документации.

Диагностические характеристики испытуемого набора будут определены по результатам клинических испытаний.

3.2. На клинические (клинико-лабораторные) испытания будут представлены:

3.2.1. Документы:

3.2.1.1. Письмо-обращение о проведении клинических испытаний от 07.09.2017 г.;

3.2.1.2. Разрешение Росздравнадзора на проведение клинических испытаний набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL № 638/2017 от 28.08.2017 (копия);

3.2.1.3. Программа клинических испытаний, утвержденная 07 сентября 2017 г.;

3.2.1.4. Заявление на регистрацию;

3.2.1.5. Технические условия (ТУ 21.20.23.110-279-01897593-2017) испытуемого набора;

3.2.1.6. Инструкция по применению испытуемого набора;

3.2.1.7. Акт оценки результатов технических испытаний набора № 99/2017-01 ПМИ от 12 апреля 2017 г. с приложениями;

3.2.1.8. Дополнение к Акту оценки результатов технических испытаний медицинского изделия для диагностики *in vitro* № 99/2017-01 ПМИ от 12 апреля 2017 г., программе и методике проведения технических испытаний № 99/2017-01 ПМИ и протоколу технических испытаний № 99/2017-01 ПТИ от 12 апреля 2017 г.;

3.2.1.9. Сведения о нормативной документации;

3.2.1.10. Лабораторно-экспериментальный отчет о разработке набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL;

3.2.1.11. Данные по стабильности испытуемого набора (протокол оценки стабильности набора реагентов, отчет (промежуточный/ окончательный) о проведении проверки стабильности набора реагентов);

3.2.1.12. Фотографии испытуемого набора;

3.2.1.13. Паспорт качества на испытуемый набор формы комплектации 1 (серия 13.03.17, срок годности до 13.03.18);

3.2.1.14. Паспорт качества на испытуемый набор формы комплектации 2 (серия

- 13.03.17, срок годности до 13.03.18);
- 3.2.1.15. Вкладыши к испытываемым наборам;
- 3.2.1.16. Краткое руководство на набор реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL;
- 3.2.1.17. Регистрационное удостоверение к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» № ФСР 2008/03147 от 24 марта 2017 (далее – комплект реагентов «РИБО-преп»);
- 3.2.1.18. Инструкция по применению комплекта реагентов «РИБО-преп»;
- 3.2.1.19. Паспорт комплекта реагентов «РИБО-преп» формы комплектации 2 серии 03.09.17 срок годности до 03.06.18;
- 3.2.1.20. Регистрационное удостоверение к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «МАГНО-сорб» № ФСР 2010/07265 от 05.05.2012 г. (далее – комплект реагентов «МАГНО-сорб»);
- 3.2.1.21. Инструкция по применению комплекта реагентов «МАГНО-сорб»;
- 3.2.1.22. Паспорт на комплект реагентов «МАГНО-сорб» форма комплектации 2, серия 27.02.17 срок годности до 27.05.18;
- 3.2.1.23. Паспорт штамма микроорганизма *Borrelia miyamotoi* Izh-4;
- 3.2.1.24. Справка о депонировании авторского штамма микроорганизма *Borrelia miyamotoi* Izh-4 в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»;
- 3.2.1.25. Инструкция по применению набора реагентов для выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*) производства АО «Вектор-Бест», Россия (далее – набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*», набор сравнения);
- 3.2.1.26. Паспорт на набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*» (АО «Вектор-Бест», Россия) комплект 2, серия 12, срок годности до 17.04.2018 г.
- 3.2.1.27. Регистрационное удостоверение на набор реагентов РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi* № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 г. (копия).
- 3.2.2. Следующие образцы медицинских изделий:
- 3.2.2.1. Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) формы комплектации 1 серии 13.03.17, срок годности до 13.03.2018 – 14 наборов;

- 3.2.2.2. Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) форма комплектации 2 серии 13.03.17, срок годности до 13.03.2018 – 14 наборов;
- 3.2.2.3. Набор реагентов для выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*) (АО «Вектор-Бест», Россия) комплект 2, серия 12, срок годности до 17.04.2018 – 14 шт.;
- 3.2.2.4. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» форма комплектации 2 (серия 03.09.17 срок годности до 03.06.18) – 7 шт.;
- 3.2.2.5. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «МАГНО-сорб» форма комплектации 2, серия 27.02.17, срок годности до 27.05.18 (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07265 от 05.05.2012 г.) – 1 шт.;
- 3.2.2.6. Инактивированный штамм *Borrelia miyamotoi* Izh-4 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск», регистрационный номер: В-8324 – 1 шт.

Предоставление испытуемого набора реагентов и дополнительных изделий обеспечивает ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

4. Контингенты и материал исследования.

Материалом исследования будет являться кровь, тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал, ликвор, клещи, указанные в назначении испытуемого набора.

В качестве исследуемого материала будут изучены следующие образцы биологического материала:

- кровь от 131 пациента с лихорадочным заболеванием, возникшим после присасывания клеща, собранная на базе Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга;
- 50 образцов ликвора от пациентов инфекционных больниц № 1 и № 2 (ИКБ № 1 и ИКБ № 2) г. Москвы с менингитами иной этиологии;
- 50 образцов аутопсийного материала от умерших пациентов с иной этиологией заболевания из ИКБ № 1 и ИКБ № 2 г. Москвы;
- 200 клещей *I. ricinus*, собранных в Москве и Московской области в 2017 году;

- 50 образцов крови, взятой в межэпидемический период по иксодовым клещевым инфекциям от пациентов ИКБ № 1 и ИКБ № 2 г. Москвы с заболеваниями иной этиологии.

С использованием проб ликвора, образцов аутопсийного материала, клещей будут приготовлены модельные пробы, контаминированные штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» в конечной концентрации 10^3 копий/мл: 20 проб ликвора, 20 проб аутопсийного материала и 20 образцов суспензий клещей (ДНК из которых будет выделена дважды, используя комплекты для выделения ДНК: «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб»). Всего ДНК будет выделена из 561 пробы биологического материала и амплифицирована с использованием испытываемого набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL в двух формах комплектации и с использованием препарата сравнения – набора реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*», РУ № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 г., производства АО «Вектор-Бест», Россия.

Шифрование (обезличенных) образцов, проведение испытаний на образцах биологического материала будет проведено на базе лаборатории ФГБУ «Поликлиники № 1» Управления делами Президента Российской Федерации.

Информированное согласие пациентов не требуется ввиду особенностей получения клинического материала для исследования *in vitro*.

5. Дизайн исследований.

5.1. Вид планируемых испытаний – сравнительные.

5.2. Оценка внешнего вида испытываемого набора двух форм комплектации, комплектности, упаковки и маркировки и соответствие этих показателей качества, указанным в эксплуатационной, технической и нормативной документации.

5.3. Исследование диагностических характеристик испытываемого набора.

Испытания предполагают параллельное проспективное сравнительное исследование диагностических характеристик набора АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL на основании сопоставления результатов параллельного тестирования одних и тех же клинических образцов от пациентов и модельных проб, контрольной группы двумя ПЦР-наборами: испытываемым в двух формах комплектации и набором сравнения – РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*, РУ № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 г., производства АО «Вектор-Бест», Россия, который является единственным зарегистрированным в Российской Федерации ПЦР-набором для выявления ДНК *B. miyamotoi*.

Диагностические чувствительность и специфичность будут рассчитаны в соответствии с формулами в таблицах 1 и 2.

Диагностическая чувствительность

Число образцов с истинно положительными результатами анализа	Негативный результат	Позитивный результат
N	A	B
Диагностическая чувствительность (доля позитивных результатов теста в группе положительных образцов) составляет $B/(A+B)*100 =$ _____ %		

N – общее число исследуемых проб с истинно положительными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

A – число исследуемых проб, для которых был получен отрицательный результат, из общего числа **N**,

B – число исследуемых проб, для которых был получен положительный результат, из общего числа **N**.

Таблица 2

Диагностическая специфичность

Число образцов с истинно отрицательными результатами анализа	Негативный результат	Позитивный результат
N	A	B
Диагностическая специфичность (доля негативных результатов теста в группе отрицательных образцов) составляет $A/(A+B)*100$ _____ %		

N – общее число исследуемых проб с истинно отрицательными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

B – число исследуемых проб, для которых был получен положительный результат, из общего числа **N**,

A – число исследуемых проб, для которых был получен отрицательный результат, из общего числа **N**.

Диагностические характеристики будут рассчитываться с доверительной вероятностью 95 %.

Согласно пункту 47 действующего «Порядка проведения оценки соответствия медицинских изделий в форме технических испытаний, токсикологических исследований,

клинических испытаний в целях регистрации медицинских изделий», утвержденного Приказом № 2н Минздрава России от 09 января 2014 г., клинико-лабораторные испытания медицинских изделий для диагностики *in vitro* новых или редко встречающихся природно-очаговых инфекционных заболеваний проводятся в лабораторных условиях с применением музейных тест-штаммов из государственных, национальных, исследовательских и иных коллекций патогенных микроорганизмов.

Летальные исходы от боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*, в настоящее время не зарегистрированы. Отмечен 1 случай менингоэнцефалита, ассоциированный с *Borrelia miyamotoi* (Hovius JW, de Wever B, Sohne M. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. Lancet. 2013 Aug 17;382(9892):658. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61644-X). В связи с этим не представляется возможным собрать достаточное для оценки диагностической чувствительности число образцов следующего клинического материала, заявленного производителем: тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал и ликвор. Диагностическая чувствительность на этих видах клинического материала будет изучена с использованием модельных проб, контаминированных штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 в концентрации 10^3 копий/мл.

5.4. Анализ клинической безопасности испытуемого набора будет проведен согласно экспериментальной апробации инструкции по применению испытуемого набора и анализу документов о проверке стабильности.

6. База испытаний.

Клинические испытания набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL будут проводиться на базе Федерального Государственного бюджетного учреждения «Поликлиника № 1» Управления делами Президента Российской Федерации (ФГБУ «Поликлиника № 1» УДП РФ) в клинико-диагностической лаборатории.

Продолжительность испытаний – 6 месяцев.

Сбор и подготовка биологического материала:

- Сбор крови от больных лихорадочным заболеванием, возникшим после присасывания клеща, будет проводиться на базах Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга;
- Сбор ликвора от пациентов с менингитами иной этиологии будет проводиться на базах ИКБ № 1 и ИКБ № 2 г. Москвы;
- Сбор аутопсийного материала будет проводиться от умерших пациентов с иной этиологией заболевания из ИКБ № 1 и ИКБ № 2 г. Москвы;
- Сбор клещей *I. ricinus* проведен в Москве и Московской области в 2017 году.

- Сбор крови для контрольной группы будет проводиться в межэпидемический период по иксодовым клещевым инфекциям от пациентов из ИКБ № 1 и ИКБ № 2 г. Москвы с заболеваниями иной этиологии.

Истинно отрицательные образцы ликвора, а также аутопсийный материал от пациентов с иной патологией заболевания и отрицательные на *Borrelia miyamotoi* суспензий клещей *I. ricinus* будут использованы для подготовки модельных проб.

До проведения исследований предварительная подготовка биологического материала будет осуществляться согласно инструкции к набору реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL.

При контаминации проб биологического материала штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 будут взяты 90 мкл гомогената аутопсийного материала, 90 мкл осветленной клещевой суспензии, осадок ликвора с 90 мкл надосадочной жидкости и к ним добавлены по 10 мкл штамма Izh-4 в концентрации 10^4 копий/мл. Таким образом будет проведено изучение диагностической чувствительности испытуемого набора на этих видах биологического материала. Модельные пробы будут готовиться сотрудниками ФГБУ «Поликлиники № 1» Управления делами Президента РФ.

Испытуемые пробы для ПЦР будут зашифрованы сотрудниками ФГБУ «Поликлиника № 1» Управления делами Президента РФ, не принимающими участия в постановке ПЦР и учете результатов.

Информированное согласие пациентов не требуется ввиду особенностей получения клинического материала для исследования *in vitro*.

Выделение ДНК из образцов биологического материала будет проведено с использованием комплектов реагентов «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб» согласно инструкции по применению комплектов реагентов.

Исследование зашифрованных образцов выделенной ДНК методом ПЦР будет проводиться с использованием оборудования Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), РУ № ФСЗ 2010/07595, серийный номер № R0912163, № R0512199.

7. Условия проведения испытаний.

Работа будет проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и

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».

При работе будут выполняться следующие требования:

- Исследуемые образцы будут рассматриваться как инфекционно-опасные, работа и хранение организовываться в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Разлитые образцы будут убираться и дезинфицироваться, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».
- Лабораторный процесс будет однонаправленным, анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работа начнется в Зоне Экстракции, продолжится в Зоне Амплификации и Детекции. Образцы, оборудование и реагенты в зону, не будут возвращаться в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, будут удаляться в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.
- Будут использоваться и меняться при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) будет сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ будут подвергаться ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- К работе с набором реагентов будут допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинито-

диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

- Не будет использоваться набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не будет использоваться набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не будет использоваться набор реагентов по истечении срока годности.

Климатические условия при испытаниях: температура воздуха от 20 до 28 °С, относительная влажность не более 75 %.

8. Методы (изделия) сравнения.

Для изучения диагностических характеристик в качестве препарата сравнения будет использован единственный зарегистрированный в РФ ПЦР-набор для выявления ДНК заявленного микроорганизма: набор реагентов для выявления ДНК *B.miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*), РУ № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 г., производства АО «Вектор-Бест», Россия, в количестве 14 шт.

Программу клинических испытаний набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL разработали:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии

Роспотребнадзора

11123, г. Москва, ул. Новогиреевская,
д.3А, Тел. 8(495) 305 54 24, Факс: 8(495)

974 96 46, e-mail: karan@pcr.ru

Руководитель научной группы
разработки новых методов диагностики
природно-очаговых заболеваний

 Л.С. Карань

ФГБУ «Поликлиника № 1» Управления
делами Президента РФ

119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек,
д.26/28

Главный исследователь, начальник
организационно-методического отдела
ФГБУ «Поликлиника № 1»

 В.В. Книга

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный врач Федерального
Государственного бюджетного учреждения
«Поликлиника № 1» Управления делами
Президента Российской Федерации



Е.В. Ржевская

2018 г.

ПРОТОКОЛ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL
по ТУ 21.20.23.110-279-01897593-2017,
производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия
№ 11 от 05 марта 2018 г.

1. Условия и место проведения испытаний: Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Поликлиника № 1» Управления делами Президента Российской Федерации.

Документы, удостоверяющие полномочия испытательной лаборатории с указанием области аккредитации: Приказ Росздравнадзора № 1971 от 26.03.2014 года, Письмо Росздравнадзора № 01-5588/14 от 26.03.2014 года «О включении в Перечень Медицинских организаций, проводящих клинические испытания медицинских изделий»; Лицензия на осуществление медицинской деятельности от 30 апреля 2014 г. № ФС-99-01-008836 сроком действия – бессрочно.

Наименование направляемого на испытания медицинского изделия: Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL.

Заказчик (фирма-производитель): ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская 3а, тел.: (495)974-96-42, факс: (495)305-54-23.

Срок проведения клинических испытаний: с 07 сентября 2017 г. по 05 марта 2018 г.

2. Цель испытаний

Проверка соответствия испытываемого набора представленной нормативной документации, технической и эксплуатационной документации производителя.

Проверка соответствия испытываемого набора предназначенному производителем назначению и предлагаемым им методам использования.

Проверка полноты и достоверности установленных технической и эксплуатационной документацией производителя заявленных характеристик качества, безопасности и эффективности испытуемого набора в соответствии с предназначенным производителем применением медицинского изделия по назначению, в том числе определение его диагностических характеристик, указанных в эксплуатационной документации производителя.

Оценка возможности применения данного медицинского изделия в практике медицинских учреждений Российской Федерации.

3. Дизайн исследования.

Клинические (клинико-лабораторные) испытания диагностической ценности набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL, разработанного в ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, проводились на базе испытательной лаборатории ФГБУ «Поликлиника № 1» Управления Делами Президента Российской Федерации с 07 сентября 2017 г. по 05 марта 2018 г. согласно утвержденной программе клинических испытаний от 07 сентября 2017 г.

Клинико-лабораторные испытания состояли из следующих этапов:

- 1) Идентификация испытуемого набора, включающая оценку внешнего вида, комплектности, упаковки и маркировки, и соответствие этих показателей качества, указанным в эксплуатационной, технической и нормативной документации;
- 2) Экспериментальная апробация инструкции по применению испытуемого набора;
- 3) Анализ клинической безопасности испытуемого набора согласно экспериментальной апробации инструкции по применению испытуемого комплекта и анализу документов о проверке стабильности;
- 4) Определение диагностических характеристик испытуемого набора (чувствительности и специфичности) с использованием единственного зарегистрированного в РФ препарата сравнения – набора реагентов для выявления ДНК *B.miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*), РУ № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 г., производства АО «Вектор-Бест», Россия;

4. Условия проведения испытаний.

Работа проводилась в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-

эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и 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».

При работе выполнялись следующие требования:

- Исследуемые образцы рассматривались как инфекционно-опасные, работа и хранение организовывались в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Разлитые образцы убирались и дезинфицировались, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».
- Лабораторный процесс был однонаправленным. Анализ проводился в отдельных помещениях (зонах). Работу начиналась в Зоне Экстракции, продолжалась в Зоне Амплификации и Детекции. Образцы, оборудование и реагенты не возвращались в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, удалялись в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».
- При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) не было допущено открывания пробирок и разбрызгивания содержимого, поскольку это могло привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.
- Использовались и менялись при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) сбрасывалась в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ подвергалась ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-

исследования указанного количества проб.

- Набор реагентов готов к применению согласно инструкции. Набор применялся строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускались только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовался набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовался набор реагентов по истечении срока годности.

Климатические условия при испытаниях: температура воздуха от 20 до 28 °С, относительная влажность не более 75 %.

Выделение ДНК из образцов было проведено с использованием комплектов реагентов «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб» согласно инструкции по применению комплектов реагентов.

Исследование зашифрованных образцов выделенной ДНК методом ПЦР проводилось на программируемом амплификаторе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), РУ № ФСЗ 2010/07595, серийный номер № R0912163, № R0512199, согласно инструкции к набору реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL.

5. Назначение набора реагентов.

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL (далее – набор реагентов, испытываемый набор), предназначен для качественного определения ДНК *Borrelia miyamotoi* в биологическом материале (кровь, тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал, ликвор, клещи) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала.

Набор реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN

Состав комплекта:

- ПЦР-смесь-FL *Borrelia miyamotoi* - 1 пробирка;

- ПЦР-буфер-Н - 1 пробирка;
- К+ *Borrelia miyamotoi* - 1 пробирка;
- К- - 1 пробирка;
- ВКО-FL - 1 пробирка;
- ОКО - 1 пробирка.

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Состав комплекта:

- ПЦР-смесь *Borrelia miyamotoi*-Lyo - 48 пробирок;
- К+ *Borrelia miyamotoi* - 1 пробирка;
- К- - 1 пробирка;
- ВКО-FL - 1 пробирка;
- ОКО - 1 пробирка.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147), и «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265). Форма комплектации 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма комплектации 2 рассчитана на проведение 48 реакций амплификации, включая контроли.

6. Принцип метода.

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременной амплификации участков ДНК *Borrelia miyamotoi* и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридинтрифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 2 реакции – амплификация ДНК *Borrelia miyamotoi*, а также амплификация последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК *Borrelia miyamotoi*, а также ДНК ВКО-FL регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции:

Канал для флуорофора	FAM	ROX
ДНК-мишень	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i>
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	glpQ ген

7. Материал для исследования.

В качестве исследуемого материала были изучены следующие образцы биологического материала:

- кровь от 131 пациента с лихорадочным заболеванием, возникшим после присасывания клещей, собранная на базах Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга;

- 50 образцов ликвора от пациентов инфекционных больниц № 1 и № 2 (ИКБ № 1 и ИКБ № 2) г. Москвы с менингитами иной этиологии;

- 50 образцов аутопсийного материала от умерших пациентов с иной этиологией заболевания из ИКБ № 1 и ИКБ № 2 г. Москвы;

- 200 клещей *I. ricinus*, собранных в Москве и Московской области в 2017 году;

- 50 образцов крови, взятой в межэпидемический период по иксодовым клещевым инфекциям от пациентов ИКБ № 1 и ИКБ № 2 г. Москвы с заболеваниями иной этиологии.

Были приготовлены модельные пробы, контаминированные штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» в конечной концентрации 10^3 копий/мл из отрицательных

образцов биологического материала: 20 проб ликвора, 20 проб аутопсийного материала и 20 образцов суспензий клещей. Всего ДНК была выделена из 561 пробы биологического материала и амплифицирована с использованием испытуемого набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL в двух формах комплектации и с использованием препарата сравнения – набора реагентов для выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции (РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*), РУ № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 г., производства АО «Вектор-Бест», Россия.

Шифрование обезличенных образцов, проведение испытаний на образцах биологического материала проведено на базе лаборатории «Поликлиники № 1» Управления делами Президента Российской Федерации.

8. Результаты исследования.

Испытуемые наборы оценивались по следующим показателям: оценка внешнего вида, комплектности, упаковки и маркировки, идентификация наборов по этим показателям, указанным в эксплуатационной, технической и нормативной документации производителя, оценка диагностической чувствительности и диагностической специфичности, безопасности использования.

8.1. Описание испытуемого набора с точки зрения его идентификации.

На клинические испытания представлены наборы реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL формы комплектации 1 серии 13.03.17, срок годности до 13.03.2018 и формы комплектации 2 серии 13.03.17, срок годности до 13.03.2018.

В состав испытуемого набора реагентов формы комплектации 1 серии 13.03.17 входили следующие реагенты (см. Таблицу 1):

Таблица 1

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Borrelia miyamotoi</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
К+ <i>Borrelia miyamotoi</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

В состав испытуемого набора реагентов формы комплектации 2 серии 13.03.17 входили следующие реагенты (см. Таблицу 2):

Таблица 2

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>Borrelia miyamotoi</i> -Lyo	Порошок белого цвета	–	48 пробирок объемом 0,2 мл
К+ <i>Borrelia miyamotoi</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Идентификация представленных двух форм комплектации набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL прошла успешно. Комплектность, упаковка и маркировка испытуемого набора представленных двух форм комплектации соответствует указанным в ТУ 21.20.23.110-279-01897593-2017, в паспортах качества, вкладышах, в кратком руководстве, инструкции по применению, представленных фотографиях, свидетельстве о нормативной документации.

8.2. Изучение диагностических характеристик испытуемого набора (чувствительности и специфичности) на заявленном в назначении испытуемого набора биологическом материале.

Диагностическая чувствительность была изучена на образцах крови от пациентов Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга с лихорадкой, возникшей после присасывания клеща. Для тех видов заявленного биологического материалов, для которых нет репрезентативного количества образцов для проведения клинических испытаний (ликвора, аутопсийного материала, клещей) изучение диагностической чувствительности было проведено при исследовании модельных проб, контаминированных штаммом *B.miyamotoi* Izh-4.

Диагностическая специфичность изучена на образцах крови от пациентов Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга с лихорадкой, возникшей после присасывания клеща, но вызванной другим, отличным от *B.miyamotoi*; возбудителем, и от пациентов ИКБ № 1 и ИКБ № 2 г. Москвы с иной этиологией заболевания; на образцах иксодовых клещей *I.ricinus*, не зараженных *Borrelia miyamotoi*; на образцах аутопсийного материала и ликвора от пациентов с иной этиологией заболевания. Сравнение проводилось с ПЦР-набором «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*», РУ № РЗН 2014/1405 от 26.05.2017 г., производства АО «Вектор-Бест», Россия. Модельные пробы готовились сотрудниками лаборатории ФГБУ «Поликлиника № 1» Управления делами Президента Российской Федерации.

Исследуемый материал и объём исследования для оценки диагностических характеристик, полученный от больных с подозрением на заболевание, вызванное *B.miyamotoi*; а также клещей *I.ricinus* (см. Таблицу 3):

Таблица 3.

Вид исследуемого материала	Число проб
Кровь от пациентов Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга с лихорадкой, возникшей после присасывания клеща	131
Суспензии из клещей, собранных в Москве и Московской области	200
Всего	331

Исследуемый материал и объём исследования для оценки диагностической специфичности, полученный от пациентов с иной этиологией заболевания (см. Таблицу 4):

Таблица 4.

Вид исследуемого материала	Число проб
Кровь от пациентов с иной этиологией заболевания	50
Ликвор от пациентов с иной этиологией заболевания	50
Аутопсийный материал от пациентов с иной этиологией заболевания	50
Всего	150

Согласно пункту 47 действующего «Порядка проведения оценки соответствия медицинских изделий в форме технических испытаний, токсикологических исследований, клинических испытаний в целях регистрации медицинских изделий», утвержденного Приказом № 2н Минздрава России от 09 января 2014 г., клинико-лабораторные испытания медицинских изделий для диагностики *in vitro* новых или редко встречающихся природно-очаговых инфекционных заболеваний проводятся в лабораторных условиях с применением музейных тест-штаммов из государственных, национальных, исследовательских и иных коллекций патогенных микроорганизмов.

Летальные исходы от боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*, в настоящее время не зарегистрированы. Отмечен 1 случай менингоэнцефалита, ассоциированный с *Borrelia miyamotoi* (Hovius JW, de Wever B, Sohne M. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet*. 2013 Aug 17;382(9892):658. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61644-X). В связи с этим не представляется возможным собрать достаточное для оценки диагностической чувствительности число образцов такого клинического материала, заявленного производителем, как тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал и ликвор. Из 200 клещей *I.ricinus*, собранных в Москве и Московской области, оказалось только шесть особей, зараженных *Borrelia miyamotoi*.

Поэтому диагностическая чувствительность испытуемого набора с использованием этих видов биологического материала изучалась на модельных пробах ликвора, тканевого (аутопсийного, биопсийного) материала, суспензий клещей, контаминированных штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 в конечной концентрации 10^3 копий/мл (Таблица 5).

Исследуемый материал и объём исследования для изучения диагностической чувствительности с использованием модельных образцов, контаминированных штаммом *B.miyamotoi* Izh-4 в концентрации 10^3 копий/мл (см. Таблицу 5):

Таблица 5.

Вид исследуемого материала	Число проб
Ликвор от пациентов с иной этиологией заболевания, контаминированный штаммом <i>B.miyamotoi</i> в концентрации 10^3 копий/мл	20
Аутопсийный материал от пациентов с иной этиологией заболевания, контаминированный штаммом <i>B.miyamotoi</i> в концентрации 10^3 копий/мл	20
Суспензии клещей, контаминированные штаммом <i>B.miyamotoi</i> в концентрации 10^3 копий/мл	20x2 (исследование материала с использованием двух наборов для экстракции ДНК «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб»)
Всего	80

Таким образом клинические испытания проведены при исследовании 561 пробы биологического материала.

8.3. Анализ клинической безопасности медицинского изделия согласно экспериментальной апробации инструкции по применению испытуемого комплекта и анализу документов о проверке стабильности.

В ходе экспериментальной апробации инструкции по применению испытуемого набора установлено, что инструкция написана ясным и понятным языком. В ней представлены следующие сведения: список сокращений; назначение; принцип метода; формы комплектации; аналитические характеристики; диагностические характеристики; меры предосторожности и сведения об утилизации; дополнительные материалы и оборудование; взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала; подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК; интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала; проведение ПЦР-исследования; экстракция ДНК из исследуемых образцов; форма комплектации 1 («ПЦР-комплект»

вариант FRT-50 FN): состав; амплификация с детекцией в режиме «реального времени», А. Подготовка пробирок для амплификации; Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»; В. Анализ и интерпретация результатов; форма комплектации 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L): состав; амплификация с детекцией в режиме «реального времени», А. Подготовка пробирок для амплификации; Б. Проведение ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»; В. Анализ и интерпретация результатов; срок годности; условия транспортирования и хранения; символы, используемые в печатной продукции.

Документы проверки стабильности набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL проанализированы и зачтены.

9. Диагностические характеристики.

Испытуемый набор оценивался по следующим показателям.

9.1. Диагностическая чувствительность

Число образцов с истинно положительными результатами анализа	Негативный результат	Позитивный результат
N	A	B
Диагностическая чувствительность (доля позитивных результатов теста в группе положительных образцов) составляет $B/(A+B)*100 =$ _____ %		

N – общее число исследуемых проб с истинно положительными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

A – число исследуемых проб, для которых был получен отрицательный результат, из общего числа N,

B – число исследуемых проб, для которых был получен положительный результат, из общего числа N.

9.2. Диагностическая специфичность

Число образцов с истинно отрицательными результатами анализа	Негативный результат	Позитивный результат
N	A	B
Диагностическая специфичность (доля негативных результатов теста в группе отрицательных образцов) составляет $A/(A+B)*100$ _____ %		

N – общее число исследуемых проб с истинно отрицательными результатами анализа, подтвержденные с помощью набора сравнения,

В – число исследуемых проб, для которых был получен положительный результат, из общего числа N,

А – число исследуемых проб, для которых был получен отрицательный результат, из общего числа N.

9.3. Результаты анализа диагностических чувствительности и специфичности для клинических образцов крови от пациентов с подозрением на иксодовый клещевой боррелиоз, вызванный *B.miyamotoi*, и клещей *I.ricinus* в сравнении с набором РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi* (АО «Вектор-Бест», Россия).

Таблица 6. Результаты выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* в крови пациентов Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга с лихорадкой после присасывания клеща

Образец	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
	Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
	FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
1	28,57	29,4	обнаружена	26,75	28,07	обнаружена	26,44	28,37	обнаружена
2	25,82	-	Не обнаружена	25,52	-	Не обнаружена	25,82	-	Не обнаружена
3	26,03	-	Не обнаружена	25,75	-	Не обнаружена	26	-	Не обнаружена
4	26,31	29,06	обнаружена	24,46	27,54	обнаружена	26,34	28,4	обнаружена
5	26,09	-	Не обнаружена	25,34	-	Не обнаружена	25,97	-	Не обнаружена
6	26,4	27,94	обнаружена	24,55	26,48	обнаружена	25,97	27,4	обнаружена
7	25,82	-	Не обнаружена	25,54	-	Не обнаружена	25,56	-	Не обнаружена
8	26	-	Не обнаружена	25,59	-	Не обнаружена	25,82	-	Не обнаружена
9	25,94	-	Не обнаружена	25,46	-	Не обнаружена	26,03	-	Не обнаружена
10	25,76	-	Не обнаружена	25,46	-	Не обнаружена	25,97	-	Не обнаружена
11	26,29	35,52	обнаружена	24,59	34,38	обнаружена	26,07	33,68	обнаружена
12	26,14	-	Не обнаружена	25,12	-	Не обнаружена	25,75	-	Не обнаружена
13	26,8	34,49	обнаружена	25	33,09	обнаружена	26,24	35,16	обнаружена
14	25,97	-	Не обнаружена	25,52	-	Не обнаружена	25,86	-	Не обнаружена
15	25,86	-	Не обнаружена	26	-	Не обнаружена	26,46	-	Не обнаружена
16	26,46	-	Не обнаружена	25,22	-	Не обнаружена	26,1	-	Не обнаружена
17	26,1	-	Не обнаружена	25,61	-	Не обнаружена	26,14	-	Не обнаружена
18	26,14	-	Не обнаружена	25,63	-	Не обнаружена	26,03	-	Не обнаружена
19	26,03	-	Не обнаружена	25,55	-	Не обнаружена	26,02	-	Не обнаружена
20	26,34	-	Не обнаружена	25,32	-	Не обнаружена	25,99	-	Не обнаружена
21	26,76	22,43	обнаружена	25,01	21,02	обнаружена	26,03	21,75	обнаружена
22	25,99	22,79	обнаружена	24,17	21,42	обнаружена	26,07	22,25	обнаружена
23	25,78	-	Не обнаружена	25,56	-	Не обнаружена	25,4	-	Не обнаружена
24	26,04	-	Не обнаружена	25,21	-	Не обнаружена	25,06	-	Не обнаружена
25	25,99	-	Не обнаружена	26,09	-	Не обнаружена	25,23	-	Не обнаружена
26	26,17	22,54	обнаружена	24,35	21,09	обнаружена	26,11	22,06	обнаружена
27	26,29	-	Не обнаружена	25,12	-	Не обнаружена	25,84	-	Не обнаружена
28	26,12	25,9	обнаружена	24,34	24,32	обнаружена	25,81	25,37	обнаружена
29	26,02	-	Не обнаружена	25,37	-	Не обнаружена	25,56	-	Не обнаружена
30	26,102	-	Не обнаружена	25,43	-	Не обнаружена	25,54	-	Не обнаружена
31	26	-	Не обнаружена	25,48	-	Не обнаружена	25,86	-	Не обнаружена
32	26,32	-	Не обнаружена	25,69	-	Не обнаружена	25,62	-	Не обнаружена
33	26,27	25,53	обнаружена	24,52	24,1	обнаружена	25,71	25,11	обнаружена
34	26,05	25,07	обнаружена	24,22	23,65	обнаружена	26,29	24,52	обнаружена
35	26,08	-	Не обнаружена	25,55	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена
36	26,26	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена	25,66	-	Не обнаружена
37	26,12	-	Не обнаружена	25,6	-	Не обнаружена	25,43	-	Не обнаружена
38	25,89	-	Не обнаружена	25,66	-	Не обнаружена	25,98	-	Не обнаружена
39	26,42	-	Не обнаружена	26,51	-	Не обнаружена	25,87	-	Не обнаружена
40	26,52	26,03	обнаружена	24,79	24,63	обнаружена	25,88	25,48	обнаружена
41	26,33	-	Не обнаружена	25,42	-	Не обнаружена	25,28	-	Не обнаружена
42	25,74	-	Не обнаружена	27,14	-	Не обнаружена	25,54	-	Не обнаружена
43	26	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена	25,62	-	Не обнаружена
44	26,11	28,02	обнаружена	24,27	26,51	обнаружена	26,32	27,4	обнаружена
45	26,07	-	Не обнаружена	25,93	-	Не обнаружена	25,94	-	Не обнаружена

Образец	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
	Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
	FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
46	25,67	-	Не обнаружена	25,03	-	Не обнаружена	26,11	-	Не обнаружена
47	25,89	24,86	обнаружена	24,12	23,54	обнаружена	25,9	24,33	обнаружена
48	25,99	27,48	обнаружена	24,09	26,07	обнаружена	25,64	26,67	обнаружена
49	26,18	-	Не обнаружена	25,29	-	Не обнаружена	26,06	-	Не обнаружена
50	26,16	-	Не обнаружена	25,54	-	Не обнаружена	25,94	-	Не обнаружена
51	26,18	26,32	обнаружена	24,4	24,93	обнаружена	25,91	25,64	обнаружена
52	26,48	-	Не обнаружена	25,31	-	Не обнаружена	26,15	-	Не обнаружена
53	26,24	-	Не обнаружена	25,37	-	Не обнаружена	26,09	-	Не обнаружена
54	26,63	25,64	обнаружена	24,87	24,18	обнаружена	26,19	25,16	обнаружена
55	26,17	24,81	обнаружена	24,21	23,39	обнаружена	26,03	24,21	обнаружена
56	26,42	-	Не обнаружена	25,24	-	Не обнаружена	25,98	-	Не обнаружена
57	26,29	-	Не обнаружена	25,25	-	Не обнаружена	26,58	-	Не обнаружена
58	26,05	-	Не обнаружена	25,28	-	Не обнаружена	26,22	-	Не обнаружена
59	26,58	-	Не обнаружена	25,79	-	Не обнаружена	26,26	-	Не обнаружена
60	26,27	23,33	обнаружена	24,55	21,96	обнаружена	26,65	22,73	обнаружена
61	26,5	-	Не обнаружена	25,01	-	Не обнаружена	25,76	-	Не обнаружена
62	25,91	-	Не обнаружена	25,38	-	Не обнаружена	25,93	-	Не обнаружена
63	26,57	23,69	обнаружена	24,8	22,26	обнаружена	26,07	23,35	обнаружена
64	26,17	-	Не обнаружена	25,4	-	Не обнаружена	25,87	-	Не обнаружена
65	26,24	-	Не обнаружена	25,32	-	Не обнаружена	25,76	-	Не обнаружена
66	26,3	32,82	обнаружена	24,43	31,48	обнаружена	25,97	31,42	обнаружена
67	25,81	-	Не обнаружена	25,11	-	Не обнаружена	25,97	-	Не обнаружена
68	26,3	-	Не обнаружена	25,33	-	Не обнаружена	25,91	-	Не обнаружена
69	26,06	-	Не обнаружена	25	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена
70	25,93	29,64	обнаружена	24,11	28,26	обнаружена	26,57	29,01	обнаружена
71	26,14	33,24	обнаружена	24,08	31,97	обнаружена	29,78	32,18	обнаружена
72	26,03	31,32	обнаружена	24,01	29,9	обнаружена	26,34	29,99	обнаружена
73	26,11	-	Не обнаружена	25,88	-	Не обнаружена	26,39	-	Не обнаружена
74	26,03	-	Не обнаружена	25,16	-	Не обнаружена	26,04	-	Не обнаружена
75	26,25	-	Не обнаружена	25,22	-	Не обнаружена	26,08	-	Не обнаружена
76	26,39	29,78	обнаружена	24,51	28,4	обнаружена	25,88	29,08	обнаружена
77	25,61	-	Не обнаружена	25,25	-	Не обнаружена	25,97	-	Не обнаружена
78	25,73	-	Не обнаружена	25,47	-	Не обнаружена	25,96	-	Не обнаружена
79	26,41	34,02	обнаружена	24,74	32,71	обнаружена	25,8	36,57	обнаружена
80	26,52	26,15	обнаружена	24,67	24,71	обнаружена	26	28,67	обнаружена
81	26,5	28,53	обнаружена	24,69	27,01	обнаружена	25,77	29,12	обнаружена
82	26,39	-	Не обнаружена	26,01	-	Не обнаружена	25,78	-	Не обнаружена
83	26,32	34,59	обнаружена	24,49	33,29	обнаружена	25,94	33,73	обнаружена
84	26,14	-	Не обнаружена	25,89	-	Не обнаружена	25,67	-	Не обнаружена
85	26,25	29,29	обнаружена	24,52	27,86	обнаружена	26,24	25,38	обнаружена
86	26,72	-	Не обнаружена	25,44	-	Не обнаружена	25,88	-	Не обнаружена
87	26,33	29,82	обнаружена	24,5	28,38	обнаружена	25,93	27,69	обнаружена
88	25,75	-	Не обнаружена	25,32	-	Не обнаружена	25,88	-	Не обнаружена
89	25,58	-	Не обнаружена	25,59	-	Не обнаружена	26,06	-	Не обнаружена
90	25,48	-	Не обнаружена	25,36	-	Не обнаружена	26	-	Не обнаружена
91	26,21	31,15	обнаружена	24,46	29,77	обнаружена	25,96	32,54	обнаружена
92	25,35	-	Не обнаружена	25,43	-	Не обнаружена	25,88	-	Не обнаружена
93	25,57	-	Не обнаружена	26,28	-	Не обнаружена	26,09	-	Не обнаружена
94	25,55	-	Не обнаружена	25,19	-	Не обнаружена	26,03	-	Не обнаружена
95	25,54	-	Не обнаружена	26,92	-	Не обнаружена	25,92	-	Не обнаружена
96	25,53	-	Не обнаружена	25,56	-	Не обнаружена	25,74	-	Не обнаружена
97	26,3	36,71	обнаружена	24,45	35,56	обнаружена	25,93	-	Не обнаружена
98	25,82	-	Не обнаружена	25,48	-	Не обнаружена	26,52	-	Не обнаружена
99	26	-	Не обнаружена	25,7	-	Не обнаружена	26,16	-	Не обнаружена
100	25,94	-	Не обнаружена	25,5	-	Не обнаружена	26,2	-	Не обнаружена
101	26,38	30,36	обнаружена	24,45	28,87	обнаружена	25,77	30,02	обнаружена
102	25,82	-	Не обнаружена	25,55	-	Не обнаружена	26,22	-	Не обнаружена
103	26,03	-	Не обнаружена	25,41	-	Не обнаружена	26,09	-	Не обнаружена
104	25,97	-	Не обнаружена	25,42	-	Не обнаружена	26,08	-	Не обнаружена
105	25,86	-	Не обнаружена	25,47	-	Не обнаружена	26,05	-	Не обнаружена
106	25,89	31,09	обнаружена	24,11	29,71	обнаружена	26,09	30,1	обнаружена
107	26,75	27,61	обнаружена	24,91	26,1	обнаружена	25,55	26,48	обнаружена
108	26,46	-	Не обнаружена	25,95	-	Не обнаружена	25,63	-	Не обнаружена
109	26,1	-	Не обнаружена	25,18	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена
110	26,14	-	Не обнаружена	25,57	-	Не обнаружена	25,75	-	Не обнаружена
111	26,03	-	Не обнаружена	25,58	-	Не обнаружена	25,63	-	Не обнаружена
112	26,02	-	Не обнаружена	25,51	-	Не обнаружена	25,71	-	Не обнаружена
113	26,36	24,67	обнаружена	24,54	23,25	обнаружена	25,87	24,41	обнаружена
114	25,06	-	Не обнаружена	25,28	-	Не обнаружена	25,84	-	Не обнаружена

Образец	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
	Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
	FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
115	25,23	-	Не обнаружена	25,52	-	Не обнаружена	25,78	-	Не обнаружена
116	24,92	-	Не обнаружена	25,17	-	Не обнаружена	25,67	-	Не обнаружена
117	25,4	-	Не обнаружена	26,05	-	Не обнаружена	26,26	-	Не обнаружена
118	26,1	23,84	обнаружена	24,37	22,41	обнаружена	26,17	23,54	обнаружена
119	26,26	-	Не обнаружена	25,33	-	Не обнаружена	25,9	-	Не обнаружена
120	26,43	-	Не обнаружена	25,39	-	Не обнаружена	25,94	-	Не обнаружена
121	26,29	-	Не обнаружена	25,44	-	Не обнаружена	25,85	-	Не обнаружена
122	26,6	24,83	обнаружена	24,92	23,33	обнаружена	25,73	24,09	обнаружена
123	26,31	-	Не обнаружена	25,65	-	Не обнаружена	25,83	-	Не обнаружена
124	26,18	-	Не обнаружена	25,51	-	Не обнаружена	25,81	-	Не обнаружена
125	26,18	25,5	обнаружена	24,53	24,11	обнаружена	26,1	24,64	обнаружена
126	26,15	-	Не обнаружена	25,76	-	Не обнаружена	26,32	-	Не обнаружена
127	26,27	-	Не обнаружена	25,55	-	Не обнаружена	26,03	-	Не обнаружена
128	26,68	-	Не обнаружена	25,61	-	Не обнаружена	26,64	-	Не обнаружена
129	25,92	-	Не обнаружена	26,46	-	Не обнаружена	26,28	-	Не обнаружена
130	26,77	28,15	обнаружена	24,71	26,65	обнаружена	25,66	27,4	обнаружена
131	26,34	-	Не обнаружена	26,01	-	Не обнаружена	26,11	-	Не обнаружена

Во время клинических испытаний набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в сравнении с набором реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*» (АО «Вектор-Бест, Россия) выявлен один дискордантный результат при тестировании образцов крови, полученных от лихорадящих больных с подозрением на боррелиоз. ДНК *B.miyamotoi* была выявлена только с использованием набора реагента АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL. Наличие дискордантного результата объясняется низкой концентрацией ДНК в образце: Ct=36,71.

Итого в результате анализа обнаружены: 40 положительных образцов крови, выявленных набором реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*», и 41 положительных образцов крови, выявленных испытуемым набором двух форм комплектации; 91 отрицательных образцов крови, выявленных набором реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*» и 90 отрицательных образцов крови, выявленных испытуемым набором двух форм комплектации.

Таблица 7. Результаты выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* в клещах *I. ricinus*

Образец	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
	Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
	FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
1	25,21	-	Не обнаружена	25,88	-	Не обнаружена	25,96	-	Не обнаружена
2	25,43	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена	25,62	-	Не обнаружена
3	25,42	-	Не обнаружена	26	-	Не обнаружена	25,81	-	Не обнаружена
4	25,45	-	Не обнаружена	25,77	-	Не обнаружена	25,88	-	Не обнаружена
5	25,5	-	Не обнаружена	25,94	-	Не обнаружена	25,58	-	Не обнаружена
6	25,43	-	Не обнаружена	26,24	-	Не обнаружена	25,76	-	Не обнаружена
7	25,43	-	Не обнаружена	25,93	-	Не обнаружена	25,52	-	Не обнаружена
8	25,31	-	Не обнаружена	25,96	-	Не обнаружена	25,64	-	Не обнаружена
9	25,64	-	Не обнаружена	25,93	-	Не обнаружена	25,47	-	Не обнаружена
10	25,3	-	Не обнаружена	25,77	-	Не обнаружена	25,57	-	Не обнаружена
11	25,49	-	Не обнаружена	26,09	-	Не обнаружена	25,58	-	Не обнаружена

Образец	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
	Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
	FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
12	25,56	-	Не обнаружена	25,55	-	Не обнаружена	25,38	-	Не обнаружена
13	25,27	-	Не обнаружена	25,87	-	Не обнаружена	25,43	-	Не обнаружена
14	25,44	-	Не обнаружена	26,17	-	Не обнаружена	25,68	-	Не обнаружена
15	25,2	-	Не обнаружена	25,73	-	Не обнаружена	25,49	-	Не обнаружена
16	25,31	-	Не обнаружена	26,1	-	Не обнаружена	25,43	-	Не обнаружена
17	25,14	-	Не обнаружена	25,66	-	Не обнаружена	25,69	-	Не обнаружена
18	25,26	-	Не обнаружена	26,09	-	Не обнаружена	25,92	-	Не обнаружена
19	25,26	-	Не обнаружена	25,53	-	Не обнаружена	25,9	-	Не обнаружена
20	25,06	-	Не обнаружена	26,14	-	Не обнаружена	25,92	-	Не обнаружена
21	25,11	-	Не обнаружена	25,79	-	Не обнаружена	26	-	Не обнаружена
22	25,37	-	Не обнаружена	26,63	-	Не обнаружена	25,92	-	Не обнаружена
23	25,17	-	Не обнаружена	26,44	-	Не обнаружена	25,92	-	Не обнаружена
24	25,13	-	Не обнаружена	26,34	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена
25	25,36	-	Не обнаружена	25,97	-	Не обнаружена	26,12	-	Не обнаружена
26	25,58	-	Не обнаружена	26,07	-	Не обнаружена	25,79	-	Не обнаружена
27	25,57	-	Не обнаружена	26,24	-	Не обнаружена	25,98	-	Не обнаружена
28	25,6	-	Не обнаружена	26,03	-	Не обнаружена	26,04	-	Не обнаружена
29	25,65	-	Не обнаружена	26,07	-	Не обнаружена	25,73	-	Не обнаружена
30	25,58	-	Не обнаружена	26,11	-	Не обнаружена	25,92	-	Не обнаружена
31	25,58	-	Не обнаружена	25,81	-	Не обнаружена	25,68	-	Не обнаружена
32	25,46	-	Не обнаружена	25,71	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена
33	25,79	-	Не обнаружена	26,29	-	Не обнаружена	25,63	-	Не обнаружена
34	25,45	-	Не обнаружена	25,88	-	Не обнаружена	25,72	-	Не обнаружена
35	25,64	-	Не обнаружена	26,32	-	Не обнаружена	25,74	-	Не обнаружена
36	25,71	-	Не обнаружена	25,9	-	Не обнаружена	25,54	-	Не обнаружена
37	25,41	-	Не обнаружена	25,64	-	Не обнаружена	25,59	-	Не обнаружена
38	25,59	-	Не обнаружена	25,91	-	Не обнаружена	25,84	-	Не обнаружена
39	25,35	-	Не обнаружена	26,19	-	Не обнаружена	25,65	-	Не обнаружена
40	25,46	-	Не обнаружена	26,03	-	Не обнаружена	25,59	-	Не обнаружена
41	25,29	-	Не обнаружена	26,65	-	Не обнаружена	25,59	-	Не обнаружена
42	25,4	-	Не обнаружена	26,07	-	Не обнаружена	25,82	-	Не обнаружена
43	25,41	-	Не обнаружена	25,97	-	Не обнаружена	25,81	-	Не обнаружена
44	25,2	-	Не обнаружена	26,57	-	Не обнаружена	25,83	-	Не обнаружена
45	25,26	-	Не обнаружена	25,56	-	Не обнаружена	25,9	-	Не обнаружена
46	25,52	-	Не обнаружена	25,49	-	Не обнаружена	25,82	-	Не обнаружена
47	25,32	-	Не обнаружена	25,67	-	Не обнаружена	25,82	-	Не обнаружена
48	25,27	32,78	обнаружена	25,41	32,71	обнаружена	25,7	34,25	обнаружена
49	25,18	-	Не обнаружена	25,59	-	Не обнаружена	26,03	-	Не обнаружена
50	25,39	-	Не обнаружена	25,94	-	Не обнаружена	25,69	-	Не обнаружена
51	25,39	-	Не обнаружена	25,61	-	Не обнаружена	25,88	-	Не обнаружена
52	25,41	-	Не обнаружена	25,66	-	Не обнаружена	25,94	-	Не обнаружена
53	25,46	-	Не обнаружена	25,6	-	Не обнаружена	25,64	-	Не обнаружена
54	25,39	-	Не обнаружена	25,45	-	Не обнаружена	25,82	-	Не обнаружена
55	25,39	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена	25,59	-	Не обнаружена
56	25,27	-	Не обнаружена	25,2	-	Не обнаружена	25,7	-	Не обнаружена
57	25,6	-	Не обнаружена	25,57	-	Не обнаружена	25,53	-	Не обнаружена
58	25,26	-	Не обнаружена	25,87	-	Не обнаружена	25,63	-	Не обнаружена
59	25,45	-	Не обнаружена	25,42	-	Не обнаружена	25,64	-	Не обнаружена
60	25,52	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена	25,45	-	Не обнаружена
61	25,23	-	Не обнаружена	25,32	-	Не обнаружена	25,5	-	Не обнаружена

Образец	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
	Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
	FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
62	25,4	-	Не обнаружена	25,78	-	Не обнаружена	25,75	-	Не обнаружена
63	25,16	-	Не обнаружена	25,17	-	Не обнаружена	25,55	-	Не обнаружена
64	25,28	-	Не обнаружена	25,83	-	Не обнаружена	25,5	-	Не обнаружена
65	25,11	-	Не обнаружена	25,51	-	Не обнаружена	25,39	-	Не обнаружена
66	25,23	-	Не обнаружена	26,35	-	Не обнаружена	25,61	-	Не обнаружена
67	25,22	-	Не обнаружена	26,16	-	Не обнаружена	25,6	-	Не обнаружена
68	25,02	33,72	обнаружена	26,06	33,45	обнаружена	25,63	34,23	обнаружена
69	25,07	-	Не обнаружена	25,65	-	Не обнаружена	25,69	-	Не обнаружена
70	25,33	-	Не обнаружена	25,76	-	Не обнаружена	25,62	-	Не обнаружена
71	25,14	-	Не обнаружена	25,94	-	Не обнаружена	25,61	-	Не обнаружена
72	25,09	-	Не обнаружена	25,73	-	Не обнаружена	25,5	-	Не обнаружена
73	25,62	-	Не обнаружена	25,76	-	Не обнаружена	25,83	-	Не обнаружена
74	25,85	-	Не обнаружена	25,81	-	Не обнаружена	25,48	-	Не обнаружена
75	25,84	-	Не обнаружена	25,51	•	Не обнаружена	25,67	-	Не обнаружена
76	25,86	-	Не обнаружена	25,41	•	Не обнаружена	25,74	•	Не обнаружена
77	25,93	-	Не обнаружена	25,99	•	Не обнаружена	25,44	•	Не обнаружена
78	25,85	-	Не обнаружена	25,56	•	Не обнаружена	25,62	•	Не обнаружена
79	25,85	-	Не обнаружена	26,04	•	Не обнаружена	25,38	•	Не обнаружена
80	25,73	-	Не обнаружена	25,59	•	Не обнаружена	25,5	•	Не обнаружена
81	26,06	-	Не обнаружена	25,34	-	Не обнаружена	25,33	•	Не обнаружена
82	25,72	-	Не обнаружена	25,59	-	Не обнаружена	25,44	•	Не обнаружена
83	25,91	-	Не обнаружена	25,88	•	Не обнаружена	25,44	•	Не обнаружена
84	25,98	•	Не обнаружена	25,73	-	Не обнаружена	25,24	•	Не обнаружена
85	25,67	•	Не обнаружена	26,35	-	Не обнаружена	25,29	-	Не обнаружена
86	25,85	-	Не обнаружена	25,76	•	Не обнаружена	25,55	•	Не обнаружена
87	25,62	•	Не обнаружена	25,66	-	Не обнаружена	25,35	•	Не обнаружена
88	25,74	-	Не обнаружена	26,28	•	Не обнаружена	25,3	•	Не обнаружена
89	25,57	-	Не обнаружена	25,78	-	Не обнаружена	25,89	•	Не обнаружена
90	25,66	•	Не обнаружена	25,7	-	Не обнаружена	26,14	•	Не обнаружена
91	25,67	-	Не обнаружена	25,9	-	Не обнаружена	26,11	-	Не обнаружена
92	25,48	-	Не обнаружена	25,65	•	Не обнаружена	26,13	-	Не обнаружена
93	25,53	-	Не обнаружена	25,83	•	Не обнаружена	26,21	•	Не обнаружена
94	25,78	-	Не обнаружена	26,14	-	Не обнаружена	26,13	-	Не обнаружена
95	25,58	•	Не обнаружена	25,83	-	Не обнаружена	26,13	-	Не обнаружена
96	25,53	•	Не обнаружена	25,86	•	Не обнаружена	26,01	•	Не обнаружена
97	25,56	•	Не обнаружена	25,83	-	Не обнаружена	26,33	•	Не обнаружена
98	25,79	-	Не обнаружена	25,67	•	Не обнаружена	26	-	Не обнаружена
99	25,77	-	Не обнаружена	26	-	Не обнаружена	26,19	•	Не обнаружена
100	25,8	•	Не обнаружена	25,44	-	Не обнаружена	26,25	•	Не обнаружена
101	25,86	•	Не обнаружена	25,78	-	Не обнаружена	25,94	-	Не обнаружена
102	25,79	-	Не обнаружена	26,08	•	Не обнаружена	26,13	-	Не обнаружена
103	25,79	-	Не обнаружена	25,63	•	Не обнаружена	25,89	•	Не обнаружена
104	25,67	•	Не обнаружена	26,01	-	Не обнаружена	26,01	-	Не обнаружена
105	26	-	Не обнаружена	25,56	•	Не обнаружена	25,84	•	Не обнаружена
106	25,65	•	Не обнаружена	26	-	Не обнаружена	25,92	-	Не обнаружена
107	25,85	•	Не обнаружена	25,42	-	Не обнаружена	25,95	-	Не обнаружена
108	25,91	32,73	обнаружена	26,05	33,18	обнаружена	25,76	34,78	обнаружена
109	25,61	•	Не обнаружена	25,7	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена
110	25,79	•	Не обнаружена	26,55	-	Не обнаружена	26,05	•	Не обнаружена
111	25,55	•	Не обнаружена	26,35	-	Не обнаружена	25,85	-	Не обнаружена

Образец	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
	Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
	FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
112	25,67	-	Не обнаружена	26,26	-	Не обнаружена	25,79	-	Не обнаружена
113	25,5	-	Не обнаружена	25,87	-	Не обнаружена	25,81	-	Не обнаружена
114	25,6	-	Не обнаружена	25,98	-	Не обнаружена	26,05	-	Не обнаружена
115	25,61	-	Не обнаружена	26,14	-	Не обнаружена	26,02	-	Не обнаружена
116	25,41	-	Не обнаружена	25,93	-	Не обнаружена	26,04	-	Не обнаружена
117	25,46	-	Не обнаружена	25,98	-	Не обнаружена	26,12	-	Не обнаружена
118	25,72	-	Не обнаружена	26,02	-	Не обнаружена	26,04	-	Не обнаружена
119	25,52	-	Не обнаружена	25,72	-	Не обнаружена	26,04	-	Не обнаружена
120	25,47	-	Не обнаружена	25,61	-	Не обнаружена	25,92	-	Не обнаружена
121	25,46	-	Не обнаружена	26,2	-	Не обнаружена	26,25	-	Не обнаружена
122	25,69	-	Не обнаружена	25,78	-	Не обнаружена	25,91	-	Не обнаружена
123	25,67	-	Не обнаружена	26,24	-	Не обнаружена	26,1	-	Не обнаружена
124	25,7	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена	26,16	-	Не обнаружена
125	25,76	-	Не обнаружена	25,55	-	Не обнаружена	25,85	-	Не обнаружена
126	25,69	-	Не обнаружена	25,81	-	Не обнаружена	26,04	-	Не обнаружена
127	25,69	-	Не обнаружена	26,09	-	Не обнаружена	25,81	-	Не обнаружена
128	25,56	-	Не обнаружена	25,93	-	Не обнаружена	25,92	-	Не обнаружена
129	25,89	-	Не обнаружена	26,56	-	Не обнаружена	25,76	-	Не обнаружена
130	25,55	-	Не обнаружена	25,97	-	Не обнаружена	25,84	-	Не обнаружена
131	25,75	-	Не обнаружена	25,87	-	Не обнаружена	25,86	-	Не обнаружена
132	25,81	-	Не обнаружена	26,48	-	Не обнаружена	25,67	-	Не обнаружена
133	25,51	-	Не обнаружена	25,3	-	Не обнаружена	25,71	-	Не обнаружена
134	25,69	-	Не обнаружена	25,22	-	Не обнаружена	25,96	-	Не обнаружена
135	25,45	-	Не обнаружена	25,39	-	Не обнаружена	25,77	-	Не обнаружена
136	25,57	-	Не обнаружена	25,11	-	Не обнаружена	25,71	-	Не обнаружена
137	25,4	-	Не обнаружена	25,31	-	Не обнаружена	25,62	-	Не обнаружена
138	25,5	-	Не обнаружена	25,7	-	Не обнаружена	25,85	-	Не обнаружена
139	25,51	-	Не обнаружена	25,35	-	Не обнаружена	25,84	-	Не обнаружена
140	25,31	-	Не обнаружена	25,41	-	Не обнаружена	25,86	-	Не обнаружена
141	25,36	-	Не обнаружена	25,33	-	Не обнаружена	25,93	-	Не обнаружена
142	25,62	-	Не обнаружена	25,19	-	Не обнаружена	25,85	-	Не обнаружена
143	25,42	-	Не обнаружена	25,56	-	Не обнаружена	25,85	-	Не обнаружена
144	25,37	-	Не обнаружена	24,9	-	Не обнаружена	25,73	-	Не обнаружена
145	25,29	-	Не обнаружена	25,33	-	Не обнаружена	26,06	-	Не обнаружена
146	25,51	-	Не обнаружена	25,63	-	Не обнаружена	25,72	-	Не обнаружена
147	25,5	-	Не обнаружена	25,16	-	Не обнаружена	25,91	-	Не обнаружена
148	25,53	-	Не обнаружена	25,54	-	Не обнаружена	25,98	-	Не обнаружена
149	25,58	27,25	обнаружена	25,04	28,29	обнаружена	25,67	28,3	обнаружена
150	25,51	-	Не обнаружена	25,51	-	Не обнаружена	25,85	-	Не обнаружена
151	25,51	-	Не обнаружена	24,87	-	Не обнаружена	25,62	-	Не обнаружена
152	25,38	-	Не обнаружена	25,57	-	Не обнаружена	25,74	-	Не обнаружена
153	25,72	-	Не обнаружена	25,28	-	Не обнаружена	25,57	-	Не обнаружена
154	25,37	-	Не обнаружена	26,13	-	Не обнаружена	25,66	-	Не обнаружена
155	25,57	-	Не обнаружена	25,92	-	Не обнаружена	25,67	-	Не обнаружена
156	25,63	-	Не обнаружена	25,83	-	Не обнаружена	25,48	-	Не обнаружена
157	25,34	-	Не обнаружена	25,38	-	Не обнаружена	25,53	-	Не обнаружена
158	25,52	-	Не обнаружена	25,49	-	Не обнаружена	25,78	-	Не обнаружена
159	25,28	-	Не обнаружена	25,7	-	Не обнаружена	25,58	-	Не обнаружена
160	25,39	-	Не обнаружена	25,49	-	Не обнаружена	25,53	-	Не обнаружена
161	25,22	-	Не обнаружена	25,49	-	Не обнаружена	25,5	-	Не обнаружена

Образец	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
	Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
	FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
162	25,33	-	Не обнаружена	25,56	-	Не обнаружена	25,66	-	Не обнаружена
163	25,33	-	Не обнаружена	25,26	-	Не обнаружена	25,61	-	Не обнаружена
164	25,13	-	Не обнаружена	25,17	-	Не обнаружена	25,5	-	Не обнаружена
165	25,18	-	Не обнаружена	25,74	-	Не обнаружена	25,7	-	Не обнаружена
166	25,45	-	Не обнаружена	25,31	-	Не обнаружена	25,64	-	Не обнаружена
167	25,25	-	Не обнаружена	25,81	-	Не обнаружена	25,53	-	Не обнаружена
168	25,2	•	Не обнаружена	25,34	•	Не обнаружена	26,12	-	Не обнаружена
169	25,66	-	Не обнаружена	25,1	-	Не обнаружена	25,76	-	Не обнаружена
170	25,89	-	Не обнаружена	25,33	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена
171	25,87	•	Не обнаружена	25,63	-	Не обнаружена	25,72	•	Не обнаружена
172	25,89	-	Не обнаружена	25,48	-	Не обнаружена	25,69	-	Не обнаружена
173	25,96	-	Не обнаружена	26,1	-	Не обнаружена	25,67	-	Не обнаружена
174	25,88	-	Не обнаружена	25,5	-	Не обнаружена	25,5	-	Не обнаружена
175	25,88	-	Не обнаружена	25,41	-	Не обнаружена	25,66	-	Не обнаружена
176	25,77	-	Не обнаружена	26,05	-	Не обнаружена	25,61	-	Не обнаружена
177	26,09	-	Не обнаружена	25,67	-	Не обнаружена	25,5	-	Не обнаружена
178	25,75	-	Не обнаружена	25,6	-	Не обнаружена	25,7	-	Не обнаружена
179	25,94	-	Не обнаружена	25,79	-	Не обнаружена	25,64	-	Не обнаружена
180	26,01	-	Не обнаружена	25,54	-	Не обнаружена	25,53	-	Не обнаружена
181	25,7	-	Не обнаружена	25,72	•	Не обнаружена	26,12	-	Не обнаружена
182	25,89	•	Не обнаружена	26,05	•	Не обнаружена	25,76	•	Не обнаружена
183	25,65	•	Не обнаружена	25,72	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена
184	25,77	•	Не обнаружена	25,77	•	Не обнаружена	25,72	•	Не обнаружена
185	25,6	-	Не обнаружена	25,72	-	Не обнаружена	25,69	-	Не обнаружена
186	25,69	•	Не обнаружена	25,56	-	Не обнаружена	25,67	-	Не обнаружена
187	25,71	-	Не обнаружена	25,9	•	Не обнаружена	25,5	-	Не обнаружена
188	25,51	-	Не обнаружена	25,32	•	Не обнаружена	25,66	•	Не обнаружена
189	25,56	23,25	обнаружена	25,68	23,51	обнаружена	25,61	24,97	обнаружена
190	25,81	-	Не обнаружена	25,98	-	Не обнаружена	25,5	•	Не обнаружена
191	25,62	-	Не обнаружена	25,53	•	Не обнаружена	25,7	-	Не обнаружена
192	25,56	•	Не обнаружена	25,9	-	Не обнаружена	25,64	•	Не обнаружена
193	25,53	-	Не обнаружена	25,44	•	Не обнаружена	25,53	-	Не обнаружена
194	25,76	-	Не обнаружена	25,89	-	Не обнаружена	26,12	-	Не обнаружена
195	25,74	•	Не обнаружена	25,3	•	Не обнаружена	25,76	•	Не обнаружена
196	25,77	•	Не обнаружена	25,94	-	Не обнаружена	25,8	-	Не обнаружена
197	25,83	-	Не обнаружена	25,6	•	Не обнаружена	25,72	•	Не обнаружена
198	25,76	-	Не обнаружена	26,45	•	Не обнаружена	25,69	-	Не обнаружена
199	25,76	29,54	обнаружена	26,81	30,77	обнаружена	25,67	31,38	обнаружена
200	25,63	-	Не обнаружена	26,14	-	Не обнаружена	25,74	-	Не обнаружена

Итого в результате анализа обнаружены: 6 положительных суспензий клещей, выявленных набором реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*» и испытуемым набором двух форм комплектации; 194 отрицательных суспензий клещей, выявленных набором реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*» и испытуемым набором двух форм комплектации.

9.3.1. Результаты анализа диагностической чувствительности для образцов крови пациентов Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга с подозрением на заболевание, вызванное *B.miyamotoi*

Число образцов, положительных при анализе с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> » (АО «Вектор-Бест», Россия)	Негативный результат	Позитивный результат
40	0	40
Диагностическая чувствительность (доля позитивных результатов теста в группе образцов с истинно-положительными результатами анализа) составляет $40/(0+40)*100=100\%$		

Нижняя граница интервала диагностической чувствительности с доверительной вероятностью 95 % составляет 91,2 %.

Итого диагностическая чувствительность при исследовании 40 образцов крови (с доверительной вероятностью 95 %) составляет 91,2-100 %.

9.3.2. Результаты анализа диагностической чувствительности для образцов клещей *I.ricinus*

Число положительных образцов суспензий клещей	Негативный результат	Позитивный результат
6 (при анализе 200 клещей <i>I.ricinus</i> , собранных в Москве и Московской области, с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> » (АО «Вектор-Бест», Россия)	0	6
20 образцов модельных проб суспензий клещей, контаминированных штаммом <i>Borrelia miyamotoi</i> Izh-4 в концентрации 10^3 копий/мл	0	20
Итого положительные образцы суспензий клещей	0	26
Диагностическая чувствительность (доля позитивных результатов теста в группе образцов с истинно-положительными результатами анализа) составляет $26/(0+26)*100 = 100\%$		

Нижняя граница интервала диагностической чувствительности определена суммарно при испытаниях 200 образцов суспензий клещей, собранных в Москве и Московской области (из них было выявлено 6 положительных образцов), и на 20 модельных пробах, контаминированных штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 в концентрации 10^3 копий/мл, диагностическая чувствительность составила 87,1 %.

Итого диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %) при исследовании 26 суспензий клещей составляет 87,1-100,0 %.

9.3.3. Результаты анализа диагностической специфичности для образцов крови от пациентов Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга с подозрением на боррелиоз (91 отрицательная проба на *B.miyamotoi*) и для образцов крови от пациентов ИКБ №№ 1 и 2 с иной этиологией заболевания (50 проб).

Данные, полученные при исследовании крови:

Число отрицательных образцов, при анализе с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> » (АО «Вектор-Бест», Россия)	Негативный результат	Позитивный результат
91 отрицательных образцов крови от пациентов Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга	90	1
50 образцов крови от пациентов ИКБ № 1 и 2	50	0
Суммарно отрицательные образцы крови	140	1
Диагностическая специфичность (доля негативных результатов теста в группе образцов с истинно-отрицательными результатами анализа) составляет $140/(140+1)*100 = 99 \%$		

Нижняя граница интервала диагностической специфичности определена при испытаниях 141 образца крови суммарно: 1) от пациентов Ижевской областной инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга с подозрением на заболевание, вызванное *B.miyamotoi* (91 отрицательная проба) и 2) для образцов крови от пациентов ИКБ №№ 1 и 2 с иной этиологией заболевания (50 проб) и составляет 94,0 %.

Итого диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %) при исследовании образцов крови составляет 94,0-99,8 %.

9.3.4. Результаты анализа диагностической специфичности для образцов клещей, отрицательных на *Borrelia miyamotoi*.

Число образцов, отрицательных при анализе с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> » (АО «Вектор-Бест», Россия)	Негативный результат	Позитивный результат
194	194	0
Диагностическая специфичность (доля негативных результатов теста в группе образцов с истинно-отрицательными результатами анализа) составляет $194/(194+0)*100 = 100 \%$		

Нижняя граница интервала диагностической специфичности определена при испытаниях 200 образцов суспензий клещей, собранных в Москве и Московской области (из них было выявлено 194 отрицательных образцов) и составляет 98,1 %.

Итого диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %) при исследовании суспензий клещей составляет 98,1-100,0 %.

9.3.5. Результаты анализа диагностической специфичности для образцов ликвора от пациентов с иной этиологией заболевания

Число образцов, отрицательных при анализе с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> » (АО «Вектор-Бест», Россия)	Негативный результат	Позитивный результат
50	50	0
Диагностическая специфичность (доля негативных результатов теста в группе образцов с истинно-отрицательными результатами анализа) составляет $50/(50+0)*100 = 100 \%$		

Нижняя граница интервала диагностической специфичности определена при анализе 50 образцов ликвора и составляет 92,9 %.

Итого диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %) при исследовании 50 отрицательных образцов ликвора составляет 92,9-100,0 %.

9.3.6. Результаты анализа диагностической специфичности для образцов аутопсийного материала от пациентов с иной этиологией заболевания

Число образцов, отрицательных при анализе с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> » (АО «Вектор-Бест», Россия)	Негативный результат	Позитивный результат
50	50	0
Диагностическая специфичность (доля негативных результатов теста в группе образцов с истинно-отрицательными результатами анализа) составляет $50/(50+0)*100 = 100 \%$		

Нижняя граница интервала диагностической специфичности определена при анализе 50 образцов аутопсийного материала и составляет 92,9 %.

Итого диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %) при исследовании 50 отрицательных образцов аутопсийного материала составляет 92,9-100 %.

9.4. Анализ диагностической чувствительности для модельных образцов биологического материала, контаминированных коллекционным штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 в концентрации 10^3 копий/мл.

Диагностическая чувствительность была проанализирована при исследовании модельных проб ликвора, аутопсийного материала, и клещей, контаминированных штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 в конечной концентрации 10^3 копий/мл. Всего было приготовлено 60 проб: 20 проб ликвора, 20 проб аутопсийного материала и 20 образцов суспензий клещей. Экстракция ДНК проводилась с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» для проб ликвора, аутопсийного материала и суспензий клещей, экстракция ДНК из суспензий клещей проводилась дважды с использованием комплектов реагентов «РИБО-преп» и «МАГНО-сорб». Итого было проанализировано 80 модельных проб.

Таблица 8. Исследованные модельные пробы ликвора, аутопсийного материала и суспензий клещей, контаминированных штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 в концентрации 10^3 копий/мл

Вид материала	Концентрация ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> в образце, копий/мл	Комплект реагентов для экстракции ДНК	Число контаминированных образцов/число выделенных проб/ %
Аутопсийный материал	1×10^3	«РИБО-преп»	20/20/100
Ликвор	1×10^3	«РИБО-преп»	20/20/100
Клещи	1×10^3	«РИБО-преп»	20/20/100
		«МАГНО-сорб»	20/20/100
Всего			60/80/100

Результаты исследования модельных образцов биологического материала приведены в таблицах 9 – 12.

Таблица 9. Результаты исследования модельных проб ликвора

Образец	Вид материала, концентрация штамма – 10^3 коп/мл	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
		Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
		FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
1	ликвор	24,31	31,32	обнаружена	23,66	30,74	обнаружена	26,31	30,38	обнаружена
2	ликвор	24,49	32,23	обнаружена	23,81	31,62	обнаружена	26,23	30,28	обнаружена
3	ликвор	24,51	32,49	обнаружена	23,83	31,91	обнаружена	26,45	31,92	обнаружена
4	ликвор	24,55	32,12	обнаружена	23,89	31,53	обнаружена	26,23	32,77	обнаружена
5	ликвор	24,56	32,46	обнаружена	23,86	31,85	обнаружена	26,4	32,38	обнаружена
6	ликвор	24,5	31,43	обнаружена	23,81	30,82	обнаружена	26,65	32,6	обнаружена
7	ликвор	24,51	32,65	обнаружена	23,83	32,05	обнаружена	26,36	34,03	обнаружена
8	ликвор	24,38	31,44	обнаружена	23,7	30,87	обнаружена	26,38	32,47	обнаружена
9	ликвор	24,72	32,55	обнаружена	24,04	31,99	обнаружена	26,38	32,67	обнаружена
10	ликвор	24,36	34,95	обнаружена	23,68	34,37	обнаружена	26,19	32,38	обнаружена
11	ликвор	24,56	33,53	обнаружена	23,87	32,9	обнаружена	26,49	34,52	обнаружена
12	ликвор	24,63	33,41	обнаружена	23,94	32,81	обнаружена	26,02	33,03	обнаружена
13	ликвор	24,38	32,45	обнаружена	23,75	31,88	обнаружена	26,29	33,89	обнаружена
14	ликвор	24,53	32,82	обнаружена	23,87	32,25	обнаружена	26,58	34,05	обнаружена
15	ликвор	24,28	31,27	обнаружена	23,61	33,01	обнаружена	26,16	32,28	обнаружена
16	ликвор	24,38	32,18	обнаружена	23,69	34,5	обнаружена	26,52	33,35	обнаружена
17	ликвор	24,22	31,89	обнаружена	23,54	33,54	обнаружена	26,12	31,27	обнаружена
18	ликвор	24,39	32,04	обнаружена	23,76	33,59	обнаружена	26,52	31,88	обнаружена
19	ликвор	24,34	32,17	обнаружена	23,67	32,9	обнаружена	26,01	32,97	обнаружена
20	ликвор	24,13	32,52	обнаружена	23,46	32,01	обнаружена	26,58	32,41	обнаружена

Таблица 10. Результаты исследования модельных проб аутопсийного материала

Образец	Вид материала, концентрация штамма – 10^3 коп/мл	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
		Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
		FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
1	аутопсия	25,01	32,7	обнаружена	23,54	31,5	обнаружена	26,55	33,23	обнаружена
2	аутопсия	24,97	32,69	обнаружена	23,6	31,35	обнаружена	25,78	33,35	обнаружена
3	аутопсия	25,29	32,4	обнаружена	23,95	31,37	обнаружена	25,98	33,03	обнаружена
4	аутопсия	25,07	32,48	обнаружена	23,53	31,4	обнаружена	26,49	33,61	обнаружена
5	аутопсия	25,25	32,23	обнаружена	23,95	32,34	обнаружена	25,72	33,5	обнаружена
6	аутопсия	25,1	33	обнаружена	23,88	31,33	обнаружена	25,85	33,03	обнаружена
7	аутопсия	24,87	32,75	обнаружена	23,64	32,72	обнаружена	26,05	33,85	обнаружена
8	аутопсия	25,43	33,59	обнаружена	23,7	32,83	обнаружена	25,73	32,81	обнаружена
9	аутопсия	25,31	31,95	обнаружена	23,99	31,89	обнаружена	25,31	33,15	обнаружена
10	аутопсия	24,71	32,58	обнаружена	23,12	32,21	обнаружена	25,87	33,83	обнаружена
11	аутопсия	24,97	32,72	обнаружена	23,63	31,75	обнаружена	26,19	34,11	обнаружена
12	аутопсия	25,08	32,57	обнаружена	23,61	31,83	обнаружена	26,5	34,57	обнаружена

Образец	Вид материала, концентрация штамма – 10 ³ коп/мл	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
		Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
		FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
13	аутопсия	24,65	30,05	обнаружена	23,42	31,47	обнаружена	25,1	34,15	обнаружена
14	аутопсия	25,95	29,91	обнаружена	24,05	32,03	обнаружена	25,26	33,57	обнаружена
15	аутопсия	25,73	31,78	обнаружена	24,03	32,26	обнаружена	25,22	34,12	обнаружена
16	аутопсия	25,65	32,14	обнаружена	23,9	32,47	обнаружена	25,1	34,74	обнаружена
17	аутопсия	25,77	32,26	обнаружена	24,09	31,89	обнаружена	25,31	33,35	обнаружена
18	аутопсия	25,78	31,96	обнаружена	23,9	33,02	обнаружена	25,25	33,04	обнаружена
19	аутопсия	25,85	32,1	обнаружена	24,46	32,11	обнаружена	25,13	34,32	обнаружена
20	аутопсия	26,17	31,86	обнаружена	24,04	31,77	обнаружена	25,72	33,65	обнаружена

Таблица 11. Результаты исследования модельных проб клещей (экстракция ДНК проводилась с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»)

Образец	Вид материала	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
		Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
		FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
1	клещи	25,19	32,27	обнаружена	23,52	31,99	обнаружена	26,19	32,72	обнаружена
2	клещи	25,48	31,91	обнаружена	23,83	32,41	обнаружена	27,02	32,69	обнаружена
3	клещи	25,28	32,62	обнаружена	23,62	32,68	обнаружена	26,34	33,07	обнаружена
4	клещи	25,26	33,14	обнаружена	23,62	32,85	обнаружена	26,98	32,72	обнаружена
5	клещи	25,89	33,01	обнаружена	23,19	32,74	обнаружена	26,52	32,84	обнаружена
6	клещи	25,67	33,14	обнаружена	24,16	33,62	обнаружена	25,34	33,87	обнаружена
7	клещи	25,74	33,67	обнаружена	24,27	32,54	обнаружена	25,4	33,73	обнаружена
8	клещи	25,04	33,83	обнаружена	24,15	33,69	обнаружена	25,34	33,71	обнаружена
9	клещи	25	35,76	обнаружена	24,21	33,53	обнаружена	25,29	33,73	обнаружена
10	клещи	25,8	32,98	обнаружена	24,78	32,77	обнаружена	25,29	33,62	обнаружена
11	клещи	25,44	32,4	обнаружена	26,22	33,6	обнаружена	25,47	34,89	обнаружена
12	клещи	25,27	31,45	обнаружена	24,96	30,21	обнаружена	25,87	33,92	обнаружена
13	клещи	25,13	31,72	обнаружена	25,88	31,29	обнаружена	26,54	33,20	обнаружена
14	клещи	25,34	32,83	обнаружена	25,91	32,28	обнаружена	25,91	33,51	обнаружена
15	клещи	25,71	32,49	обнаружена	25,34	32,16	обнаружена	26,11	32,98	обнаружена
16	клещи	25,58	32,74	обнаружена	25,14	32,36	обнаружена	26,03	33,44	обнаружена
17	клещи	25,29	32,56	обнаружена	24,92	32,04	обнаружена	26,39	33,49	обнаружена
18	клещи	25,33	33,24	обнаружена	25,09	33	обнаружена	26,54	33,83	обнаружена
19	клещи	25,62	32,87	обнаружена	25,17	32,45	обнаружена	26,47	33,27	обнаружена
20	клещи	25,48	32,67	обнаружена	25,25	32,23	обнаружена	26,39	33,02	обнаружена

Таблица 12. Результаты исследования модельных проб клещей (экстракция ДНК проводилась с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб»)

Образец	Вид материала	АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 1) серия 13.03.17			АмплиСенс® <i>Borrelia miyamotoi</i> -FL (форма комплектации 2) серия 13.03.17			РеалБест ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> (комплект 2) серия 12		
		Каналы		Результат	Каналы		Результат	Каналы		Результат
		FAM	ROX		FAM	ROX		FAM	ROX	
1	клещи	26,02	33,29	обнаружена	25,85	32,75	обнаружена	27,12	33,16	обнаружена
2	клещи	26,31	32,81	обнаружена	25,92	32,54	обнаружена	27,34	33,21	обнаружена
3	клещи	26,49	33,26	обнаружена	26,1	33,89	обнаружена	27,09	33,98	обнаружена
4	клещи	26,34	33,38	обнаружена	26,22	33,16	обнаружена	27,48	33,02	обнаружена
5	клещи	26,19	32,92	обнаружена	26	32,46	обнаружена	27,39	32,71	обнаружена
6	клещи	26,22	33,15	обнаружена	26,02	32,77	обнаружена	27,55	32,83	обнаружена
7	клещи	26,43	32,67	обнаружена	26,12	32,14	обнаружена	27,42	33,15	обнаружена
8	клещи	26,51	33,12	обнаружена	26,33	32,82	обнаружена	27,33	33,61	обнаружена
9	клещи	26,38	33,27	обнаружена	26,19	32,93	обнаружена	27,29	33,29	обнаружена
10	клещи	26,44	33,54	обнаружена	26,32	32,87	обнаружена	27,43	33,47	обнаружена
11	клещи	26,26	33,37	обнаружена	26,11	32,96	обнаружена	27,23	33,26	обнаружена
12	клещи	26,35	33,09	обнаружена	26,08	32,65	обнаружена	27,18	33,54	обнаружена
13	клещи	26,4	32,97	обнаружена	25,92	32,63	обнаружена	27,25	33,24	обнаружена
14	клещи	26,53	32,69	обнаружена	26,07	32,29	обнаружена	27,24	32,96	обнаружена
15	клещи	26,17	32,86	обнаружена	25,93	32,58	обнаружена	27,44	32,97	обнаружена
16	клещи	26,27	33,24	обнаружена	25,9	32,85	обнаружена	27,61	33,11	обнаружена
17	клещи	26,34	33,41	обнаружена	25,87	33,28	обнаружена	27,35	33,27	обнаружена
18	клещи	26,52	33,16	обнаружена	26,21	32,99	обнаружена	27,22	33,09	обнаружена
19	клещи	26,46	33,29	обнаружена	26,13	32,86	обнаружена	27,35	32,76	обнаружена
20	клещи	26,31	33,35	обнаружена	26,02	33,11	обнаружена	27,62	33,26	обнаружена

Во время клинических испытаний набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, предназначенного для качественного определения ДНК *Borrelia miyamotoi* в биологическом материале (кровь, тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал, ликвор, клещи) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации проведена проверка полноты и достоверности установленных технической и эксплуатационной документацией производителя заявленных характеристик безопасности и эффективности испытуемого набора в соответствии с предназначенным производителем применением медицинского изделия по назначению, в том числе определение его диагностических характеристик, указанных в технической и эксплуатационной документации производителя (см. Табл. 13)

Таблица 13. Итоговая таблица диагностической чувствительности и специфичности испытуемого набора реагентов.

Тип образцов	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность, (с доверительной вероятностью 95 %)
Кровь	91,2 – 100,0%	94,0 – 99,8%
Клещи	87,1 – 100,0 %	98,1 – 100,0 %
Ликвор	83,9 – 100,0 %	92,9 – 100,0 %
Аутопсийный материал	83,9 – 100,0 %	92,9 – 100,0 %

Идентификация испытуемого набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, включающая оценку внешнего вида, комплектности, упаковки и маркировки, и соответствие этих показателей качества, указанные в эксплуатационной, технической и нормативной документации производителя, проведена успешно.

Клиническая безопасность набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL согласно экспериментальной апробации инструкции по применению испытуемого набора реагентов и изучении документации о проверке стабильности, подтверждена. Исследователями установлено, что инструкция написана в полном объеме, в ней представлены все необходимые сведения о назначении, составе набора реагентов, принципе метода, подробно описана процедура экстракция ДНК из исследуемого материала. Рекомендовано исправить диагностические характеристики по итогам клинических испытаний. Итоговая версия инструкции дополнена всеми необходимыми данными и согласована с испытательной организацией.

Документы проверки стабильности набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL проанализированы и зачтены.

Безопасность испытуемого набора оценивалась при использовании в клинической практике и при удалении отходов. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 г. № 4н). Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Все необходимые меры предосторожности работы с испытуемым набором в полной мере прописаны в технической и эксплуатационной документации изделия.

Клиническая информативность доказана.

Набор реагентов безопасен при правильном использовании (согласно инструкции, в своем сроке действия) и пригоден для использования в клинической лабораторной диагностике, может быть рекомендован к регистрации в РФ.

Выводы:

1. Подтверждено соответствие испытуемого набора представленной нормативной документации, технической и эксплуатационной документации производителя.
2. Подтверждено соответствие испытуемого набора предназначенному производителем назначению и предлагаемым им методам использования.
3. Подтверждено качество набора реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, эффективность и безопасность его применения.
4. Набор реагентов АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL пригоден для использования в клинической лабораторной диагностике и может быть рекомендован к регистрации в РФ.

Главный исследователь:

Начальник организационно-методического
отдела ФГБУ «Поликлиника № 1» УДЦ РФ

д.м.н., проф. В.В. Книга

Исследователь:

Заведующий клинико-диагностической
лабораторией с испытательным центром
медицинской продукции ФГБУ
«Поликлиника № 1» УДЦ РФ

к.м.н. Н.Б.Кухтина

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по
эпидемиологии - Врио директора
Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека (ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии Роспотребнадзора)

В.Г. Акимкин
« 06 » *марта* 2018 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	12
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	13
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	16
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	16
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	16
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN)	18
СОСТАВ	18
АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ..	18
А. Подготовка пробирок для амплификации	18
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	19
В. Анализ и интерпретация результатов	21
ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)	24
СОСТАВ	24
АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ..	24
А. Подготовка пробирок для амплификации	24
Б. Проведение ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»	25
В. Анализ и интерпретация результатов	26
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	29
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	31
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.	32

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеотидтрифосфат
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
НК	- нуклеиновые кислоты
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
УДГ	- урацил-ДНК-гликозилаза
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL, далее – набор реагентов, предназначен для качественного определения ДНК *Borrelia miyamotoi* в биологическом материале (кровь, тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал, ликвор, клещи) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике.

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого материала.

В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

Набор реагентов используется для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на иксодовый клещевой боррелиоз вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, и клещей.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда забор материала не может быть осуществлен по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО-FL) и одновременной амплификации участков ДНК *Borrelia miyamotoi* и ДНК ВКО-FL с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО-FL позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Таq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и дезоксиуридинтрифосфата. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку дезоксиуридинтрифосфат входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 2 реакции – амплификация ДНК *Borrelia miyamotoi*, а также амплификация последовательности

ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК *Borrelia miyamotoi*, а также ДНК ВКО-FL регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	ROX
ДНК-мишень	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i>
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	glpQ ген

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 1: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяют выявлять ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные Производителем.

Форма комплектации 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма комплектации 2 рассчитана на проведение 48 реакций амплификации, включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий /мл
кровь	Осадок+100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10^3
тканевой (биопсийный и аутопсийный) материал	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10^3
ликвор	Осадок+100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10^3
клетки	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10^3

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий /мл
клещи	100	«МАГНО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10 ³

Данный предел обнаружения достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции ДНК».

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании следующих штаммов микроорганизмов: *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *Leptospira interrogans*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella quintana*, *B. henselae*, *Rickettsia conorii*, *R. sibirica*, *Babesia microti*, *Treponema pallidum*, а также геномной ДНК человека.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, а также ДНК человека, ДНК клещей и ДНК грызунов неспецифических реакций выявлено не было.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для оценки диагностических характеристик были использованы:

- 131 образец крови, полученный от пациентов Ижевской областной из инфекционной больницы и «Новой больницы» г. Екатеринбурга с подозрением на заболевание иксодовым клещевым боррелиозом и 50 образцов крови, взятых в межэпидемический период по иксодовым клещевым инфекциям от пациентов инфекционных больниц № 1 и № 2 г. Москвы с заболеваниями иной этиологии.
- 200 проб клещей *I. ricinus* собранных в г. Москве и Московской области;
- по 50 образцов ликвора и аутопсийного материала, взятых от пациентов инфекционных больниц № 1 и № 2 г. Москвы с заболеваниями иной этиологии;
- по 20 модельных образцов ликвора, аутопсийного материала и клещей, контаминированных штаммом *Borrelia miyamotoi* Izh-4 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk».

В качестве набора сравнения использовался набор реагентов для выявления ДНК *Borrelia miyamotoi* методом полимеразной цепной реакции в режиме

реального времени (РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*) производства АО «Вектор-Бест», Россия, регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1405.

Таблица 3

**Диагностические характеристики набора реагентов для диагностики in vitro
АмплиСенс® *Borrelia miyamotoi*-FL**

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале (%)	Диагностическая специфичность ² , (с доверительной вероятностью 95 %), в интервале (%)
Кровь	91,2 – 100,0	94,0 – 99,8
Клещи	87,1 – 100,0	98,1 – 100,0
Ликвор	83,9 – 100,0	92,9 – 100,0
Аутопсийный материал	83,9 – 100,0	92,9 – 100,0

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и 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».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории должна быть от 20 до 28 °С, относительная влажность - от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с

¹ Диагностическая чувствительность в сравнении с набором реагентов методом ПЦР.

² Диагностическая специфичность в сравнении с набором реагентов методом ПЦР.

микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром⁴. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с

³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁴ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Информационное письмо о безопасности набора реагентов доступно по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Вакуумная система забора крови Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия или аналогичные).
2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
3. Иглы пункционные (например, Гебрюдер Мартин ГмбХ & Ко. КГ (Gebruder Martin GmbH & Co. KG, Германия, или аналогичные).

4. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик» или аналогичный).
5. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб (например, DELTALAB S.L.U. («ДЕЛЬТАЛАБ С.Л.У.»), Испания или аналогичный).

Предварительная подготовка исследуемого материала

6. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2) для проведения пробоподготовки тканевого материала и клещей.
7. 96 % раствор этанола для проведения пробоподготовки клещей.
8. Глицерол для хранения обработанных клещей.
9. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 и 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
10. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
12. Штативы для пробирок объемом 1,5 и 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
13. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала и клещей.
14. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
15. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
16. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
17. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

18. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
19. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
20. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

21. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (ПУ № ФСР 2010/07265) или другие рекомендованные Производителем.
22. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

23. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neon 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) и другие, рекомендованные Производителем).
24. Набор реагентов и расходных материалов к автоматической станции (например, «МАГНО-сорб» (ПУ № ФСР 2010/07265)).

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

25. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплект» вариант FRT-50FN:
 - а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) – при использовании прибора планшетного типа;
 - в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия, или аналогичные) – при использовании прибора роторного типа.
26. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
27. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен,

Инк»), США, или аналогичные).

28. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

29. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

30. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).

31. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие рекомендованные Производителем).

32. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.

33. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

34. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- кровь,
- тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал,
- ликвор,
- клещи.

Кровь

Для повышения чувствительности метода исследуется бактериальный осадок крови. Для его получения взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой диаметром 0,8-1,1 мм в пробирку (специальную вакуумную систему) с раствором ЭДТА или цитрата натрия в качестве антикоагулянта. После взятия крови пробирку следует несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. (В противном случае кровь свернется и экстракция ДНК станет невозможной!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Допускается хранение образцов крови до получения и подготовки бактериального осадка к экстракции ДНК:

- при температуре от 20 до 25 °С – в течение 2 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 12 часов.

Недопустимо замораживание образца цельной крови!

Подготовку образцов провести не позднее указанного времени.

Тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал

Материал отбирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из участка, пограничного с поврежденным местом, или из неизмененных участков тканей органов: мозга, сердца, легких, печени, селезенки, почек, стерильным инструментом (например, пинцет) в стерильный пластиковый контейнер объемом 50 мл с плотно закрывающейся крышкой или пробирку объемом 2 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов тканевого материала:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Ликвор (спинномозговая жидкость)

Спинномозговую жидкость в количестве не менее 1 мл собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пробирки объемом 2,0 мл.

Допускается хранение образцов ликвора до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Клещи

Собранный материал разбирают в лаборатории по видам, полу, местам и датам сбора и помещают в сухие чистые пробирки объемом 2,0 мл. При объединении клещей в пулы число особей в одном пуле не должно превышать 10.

Допускается хранение материала после разбора и формирования проб:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре не выше минус 68°С или в сосуде Дюара с жидким азотом – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Допускается транспортирование вышеперечисленного материала при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 суток.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Для получения бактериального осадка крови требуется предварительная подготовка образцов крови.

Перенести 1,5 мл крови с раствором ЭДТА, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 2,0 мл. Центрифугировать 10 минут при 40 g (например, 800 об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Не захватывая осадок эритроцитов, перенести 500-600 мкл супернатанта (плазмы с лейкоцитами) отдельным наконечником с фильтром в стерильную одноразовую пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировать 10 мин при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Экстракцию ДНК проводить из осадка клеток и 100 мкл супернатанта (плазмы).

Допускается хранение бактериального осадка до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Образцы (аутопсийного, биопсийного) материала требуют предварительной подготовки.

Для экстракции ДНК берут 30-50 мг (мкл) материала и гомогенизируют его растиранием с использованием предварительно охлажденных стерильных фарфоровых ступок и пестиков или с помощью гомогенизатора. Из растёртой ткани готовят 10 % суспензию на охлажденном 0,9 % растворе натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатном буферном растворе (PBS). Для этого на 1 объём растёртой ткани добавляют 9 объёмов физиологического раствора или фосфатного буфера. 100 мкл полученной суспензии используют для экстракции ДНК.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов биопсийного материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Ликвор требует предварительной подготовки.

1-1,5 мл ликвора центрифугируют при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 10 мин. Отобрать надосадочную жидкость в контейнер для утилизации отходов. В экстракцию ДНК берут осадок клеток, находящийся в 100 мкл надосадочной жидкости.

Допускается хранение образцов ликвора до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Не допускается замораживание-оттаивание материала без процедуры экстракции ДНК.

Клещи требуют предварительной подготовки.

При исследовании пулов клещей число особей в одном пуле не должно превышать 10. Особей иксодовых клещей всех родов, кроме *Ixodes*, предпочтительнее исследовать индивидуально. Клещей поместить в пробирки объемом 1,5 мл, куда внести **500 мкл** 96%-ного этанола. Перемешать и осадить на вортексе. Удалить спирт из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра, используя вакуумный отсасыватель. Внести в пробирку **500 мкл** 0,9% раствора натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатного буферного раствора (PBS), перемешать и осадить на вортексе. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником без фильтра, используя вакуумный отсасыватель. Перенести клещей в стерильную фарфоровую чашку, добавить **300 мкл** (если проба состоит из одного клеща *Ixodes*), **600 мкл** (при исследовании иксодового клеща любого рода, кроме *Ixodes*) или **1 мл** (если гомогенизируют пул клещей) 0,9% раствора натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатного буферного раствора (PBS), гомогенизировать пробу.

Перенести пробу, используя отдельный наконечник с фильтром, в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировать в течение 2 мин при 2 тыс g (5 тыс об/мин на центрифуге MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation) для осветления пробы. Для экстракции ДНК отобрать **100 мкл** надосадочной жидкости. В оставшийся объем суспензии вносят глицерол (10% по объему оставшейся суспензии), пробу перемешивают и замораживают при температуре от минус 24 до минус 16 °С для последующего ПЦР-исследования.

Допускается хранение предварительно обработанных клещей до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для контроля эффективности экстракции ДНК и возможного ингибирования ПЦР в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который добавляют в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Непригодными для исследования являются образцы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК из разных видов исследуемого материала используются комплекты реагентов:

- «РИБО-преп» для экстракции ДНК из крови, ликвора, клещей, тканевого (аутопсийного и биопсийного) материала в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов;
- «МАГНО-сорб» для экстракции ДНК из клещей в соответствии с Приложением 1.

Объемы реагентов при экстракции с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО-FL.

Объем ВКО-FL – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл**. При исследовании крови и ликвора – осадок и **100 мкл** надосадочной жидкости. При исследовании тканевого (биопсийного и аутопсийного) материала, суспензии иксодовых клещей – **100 мкл** суспензии.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) реагент **ОКО не вносить**.

Объем элюции – **50 мкл**.

ВНИМАНИЕ! В случае проведения амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L необходимо проводить элюцию ДНК в **100 мкл** буфера для элюции.

Объемы реагентов при экстракции с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб»:

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-FL**.

Объем ВКО-FL – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца – **100 мкл** суспензии искодовых клещей.

В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл** ОКО.

Объем элюции – **100 мкл**.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN для амплификации фрагмента ДНК *Borrelia miyamotoi* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-FL <i>Borrelia miyamotoi</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
K+ <i>Borrelia miyamotoi</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 10 мкл.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси. На одну реакцию требуется 10 мкл ПЦР-смеси-FL *Borrelia miyamotoi* и 5 мкл ПЦР-буфера-Н. Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п. 7) плюс запас на одну реакцию.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирку с ПЦР-смесью-FL *Borrelia miyamotoi*. Перемешать

содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.

3. В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: ПЦР-смеси-FL *Borrelia miyamotoi* и ПЦР-буфера-Н, осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

7. Поставить контрольные реакции.
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ *Borrelia miyamotoi***.
 - б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы и контролей.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 4, 5)⁵.

⁵ Предпочтительнее использовать программу амплификации в таблице 5, при отсутствии необходимости использовать единую программу амплификации.

Таблица 4

**Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала
«АмплиСенс» для приборов роторного⁶ и планшетного⁷ типа**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, ROX	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя *Borrelia miyamotoi*, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °C – 15 минут) для экономии времени, но увеличить продолжительность шага при температуре 60 °C до 30 с в третьем цикле.

Таблица 5

**Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов
роторного⁷ и планшетного⁸ типа**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	30 с	FAM, ROX	

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа необходимо дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

⁶ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

⁷ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам:

Таблица 6

Канал для флуорофора	FAM	ROX
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла C_t в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 7

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		Результат
FAM	ROX	
определено меньше граничного	отсутствует	ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> НЕ обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
определено меньше граничного	определено больше граничного	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке

образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения C_t указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 8 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 8

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт- роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)	
		FAM	ROX
OK	Экстракция ДНК	<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.
2. Для отрицательного контроля экстракции (OK) по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо принять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам для флуорофоров FAM и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо принять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.

4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L для амплификации фрагмента ДНК *Borrelia miyamotoi* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» позволяет проводить ПЦР-исследование в качественном формате. Комплект реагентов включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь <i>Borrelia miyamotoi</i> -Lyo	Порошок белого цвета	–	48 пробирок объемом 0,2 мл
K+ <i>Borrelia miyamotoi</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
BKO-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 48 реакций амплификации, включая контроли.

АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 25 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью *Borrelia miyamotoi*-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки внести по 25 мкл проб ДНК, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью комплектов реагентов для проведения экстракции методом магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

3. Поставить контрольные реакции.

- а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К+ *Borrelia miyamotoi***.
- б) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл К-.**
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл** пробы, экстрагированной из ОКО.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок необходимо тщательно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха.

ВНИМАНИЕ! Провести ПЦР сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы и контролей. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

Б. Проведение ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл.9, 10)⁸.

Таблица 9

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного⁹ и планшетного¹⁰ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, ROX	

ВНИМАНИЕ! С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов в формате «мультипрайм» детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, кроме указанных. В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК возбудителя *Borrelia miyamotoi*, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции

⁸Предпочтительнее использовать программу амплификации в таблице 10, при отсутствии необходимости использовать единую программу амплификации.

⁹ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

¹⁰ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие рекомендованные Производителем.

(50 °C – 15 минут) для экономии времени, но увеличить продолжительность шага при температуре 60 °C до 30 с в третьем цикле.

Таблица 10

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹⁰ и планшетного¹¹ типа

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45
	60	30 с	FAM, ROX	

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

ВНИМАНИЕ! В случае неполной загрузки приборов планшетного типа необходимо дополнительно установить пустые пробирки по краям реакционного модуля амплификатора.

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

В. Анализ и интерпретация результатов

Анализ полученных результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 2 каналам:

Таблица 11

Канал для флуорофора	FAM	ROX
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i>

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) 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. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 12

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		Результат
FAM	ROX	
определено меньше граничного	отсутствует	ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> НЕ обнаружена
определено или отсутствует	определено меньше граничного	ДНК <i>Borrelia miyamotoi</i> обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
определено меньше граничного	определено больше граничного	Сомнительный**

* В случае получения **невалидного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции ДНК.

** В случае получения **сомнительного результата** необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца, начиная с этапа экстракции. В случае повторения аналогичного результата образец считать положительным. При получении отрицательного результата в повторной постановке образец считать сомнительным и рекомендовать повторное взятие материала для анализа.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 13 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 13

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		FAM	ROX
ОК	Экстракция ДНК	определено меньше граничного	отсутствует
К–	ПЦР	отсутствует	отсутствует
К+	ПЦР	определено меньше граничного	определено меньше граничного

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM и/или ROX отсутствует или превышает

граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая ДНК.

2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК, начиная с этапа экстракции ДНК.
3. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или ROX определено значение порогового цикла (C_t). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых обнаружена специфическая ДНК.
4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN при получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Форма комплектации 1. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-FL *Borrelia miyamotoi* и ПЦР-буфера-Н. ПЦР-смесь-FL *Borrelia miyamotoi*, ПЦР-буфер-Н хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Borrelia miyamotoi* хранить в защищенном от света месте.

Форма комплектации 2. Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *Borrelia miyamotoi*-Луо хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru¹¹.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских

¹¹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

Родионова

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника №1»
Управления делами Президента
Российской Федерации



Е.В. Ржевская

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов



Код партии



Использовать до



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Обратитесь к инструкции по применению



Дата изменения



Не допускать воздействия солнечного света



Температурный диапазон



Дата изготовления



Изготовитель



Беречь от влаги



Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Экстракция ДНК из 100 мкл образца клещевой суспензии с использованием комплекта реагентов «МАГНО-сорб».

Порядок работы.

1. **Лизирующий раствор МАГНО-сорб и раствор для отмывки 5** прогреть при температуре 60 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции) и промаркировать их.
3. Смешать в отдельной стерильной пробирке на 1,5 мл **ВКО-FL, компонент А и магнетизированную силику** из расчета на одну точку **10 мкл ВКО-FL, 10 мкл Компонента А и 20 мкл Магнетизированной силики**. При расчете необходимо учитывать запас – рассчитывать на одну точку больше, например:

Количество образцов для экстракции ДНК	ВКО-FL, мкл	Компонент А, мкл	Магнетизированная силика, мкл
6	70	70	140
12	130	130	260
18	190	190	380
24	250	250	500

4. Внести в пробирки по **40 мкл** подготовленной **смеси ВКО-FL, компонента А и магнетизированной силики**.
5. Внести в пробирки **900 мкл лизирующего раствора МАГНО-сорб**.
6. Добавить в каждую пробирку с лизирующим раствором **100 мкл исследуемого образца** и перемешать на вортексе.
7. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с лизирующим раствором добавить **100 мл ОКО**, перемешать на вортексе.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 10 мин.
9. Кратким центрифугированием осадить капли и перенести пробирки в магнитный штатив на **2 мин**.
10. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Перенести пробирки в обычный штатив.
11. Добавить в пробирки по **700 мкл раствора для отмывки 5**.
12. Смыть магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
13. Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в

магнитный штатив. Инкубировать **2 мин.**

14. Отобрать надосадочную жидкость и перенести пробирки в обычный штатив.

15. Повторить отмывку **раствором для отмывки 5** (пп. 11-14).

16. Аналогично провести одну отмывку **700 мкл раствора для отмывки 6**.

17. Добавить **200 мкл раствора для отмывки 7**, перемешать, а затем осадить капли на вортексе. Поставить пробирки в обычный штатив и открыть крышки.

18. Переставить пробирки в магнитный штатив на **1 мин**, затем отобрать надосадочную жидкость.

19. Высушить сорбент, оставив пробирки с открытыми крышками на магнитном штативе в течение **10 мин**.

20. Добавить **100 мкл буфера для элюции** и перемешать на вортексе.

21. Поместить пробирки в термостат при температуре 60 °C на 5 мин, через 2 мин перемешать на вортексе.

22. Коротко осадить капли на вортексе и переставить пробирки в магнитный штатив.

Инкубировать 2 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной ДНК для внесения в ПЦР осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °C в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °C в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68 °C в течение года. Для этого необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Прошито и скреплено печатью:

82 (восемьдесят два) листа

Начальник организационно-методического отдела

В.В. Книга

