

ПАСПОРТ № 3236-22

РеалБест-ОКИ ДНК Campylobacter (термофильная группа)/Shigella spp. и EIEC

Набор реагентов для выявления ДНК термофильной группы кампилобактерий, бактерий рода Shigella и энтероинвазивных E.coli методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Номер серии 1

Хранить при температуре 2-8°C

Дата изготовления 2022-09-21

Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 26°C не более 10 суток.

Дата выдачи паспорта 2022-09-21

Срок годности наборов до 2024-03-21

Состав	Внешний вид	Результаты контроля
Положительный контрольный образец (ПКО), серия 1	Бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), серия 1	Аморфная масса белого цвета, 96 пробирок	Аморфная масса белого цвета, 96 пробирок (соответствует)
Оптическая плёнка	Прозрачная бесцветная плёнка на полимерной основе, 1,5 листа	Прозрачная бесцветная плёнка на полимерной основе, 1,5 листа (соответствует)
Вкладыш со штрих-кодом	Бумажный лист со штрих-кодом, 1 шт.	Бумажный лист со штрих-кодом, 1 шт. (соответствует)
Показатель	Норма	Результаты контроля
Аналитическая чувствительность выявления ДНК Campylobacter spp. (СОП 05-2-1030), копий в ПЦР-пробе	100	100 (соответствует)
Аналитическая чувствительность выявления ДНК Shigella spp. и EIEC (СОП 05-2-1030), копий в ПЦР-пробе	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК Campylobacter spp. (СОП 05-2-1030), %	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК Shigella spp. и EIEC (СОП 05-2-1030), %	100	100 (соответствует)

Заключение: Соответствует требованиям
ТУ 21.20.23-187-23548172-2022

по упаковке, маркировке, комплектности и по показателям качества

Начальник ОБТК

В.В. ШАПРОВ



ПАСПОРТ № 3237-22

РеалБест-ОКИ ДНК *Campylobacter* (термофильная группа)/*Shigella* spp. и EIEC

Набор реагентов для выявления ДНК термофильной группы кампилобактерий, бактерий рода *Shigella* и интеновазисных *E.coli* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Номер серии 2

Хранить при температуре 2-8°C

Дата изготовления 2022-09-22

Транспортировать при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование при температуре до 26°C не более 10 суток.

Дата выдачи паспорта 2022-09-22

Срок годности наборов до 2024-03-22

Состав	Внешний вид	Результаты контроля
Положительный контрольный образец (ПКО), серия 2	Бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл	Бесцветная жидкость, 1 пробирка, 1 мл (соответствует)
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), серия 2	Аморфная масса белого цвета, 96 пробирок	Аморфная масса белого цвета, 96 пробирок (соответствует)
Оптическая плёнка	Прозрачная бесцветная плёнка на полимерной основе, 1,5 листа	Прозрачная бесцветная плёнка на полимерной основе, 1,5 листа (соответствует)
Вкладыш со штрих-кодом	Бумажный лист со штрих-кодом, 1 шт.	Бумажный лист со штрих-кодом, 1 шт. (соответствует)
Показатель	Норма	Результаты контроля
Аналитическая чувствительность выявления ДНК <i>Campylobacter</i> spp. (СОП 05-2-1030), копий в ПЦР-пробе	100	100 (соответствует)
Аналитическая чувствительность выявления ДНК <i>Shigella</i> spp. и EIEC (СОП 05-2-1030), копий в ПЦР-пробе	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК <i>Campylobacter</i> spp. (СОП 05-2-1030), %	100	100 (соответствует)
Специфичность выявления ДНК <i>Shigella</i> spp. и EIEC (СОП 05-2-1030), %	100	100 (соответствует)

Заключение: Соответствует требованиям
ТУ 21.20.23-187-23548172-2022

по упаковке, маркировке, комплектности и по показателям качества

Начальник ОБТК

В.В. ШАПРОВ



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

«12» апреля 2023 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК термофильной группы кампилобактерий, бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
«РеалБест-ОКИ ДНК Campylobacter (термофильная группа)/Shigella spp. и EIEC»

ВВЕДЕНИЕ

Острые кишечные инфекции (ОКИ) занимают одно из ведущих мест в структуре заболеваемости детей и взрослых. Вспышки ОКИ разной этиологии регистрируются как среди населения, так и в организованных коллективах. Возбудителями ОКИ являются множество вирусов, бактерии и их токсины, а также грибы и простейшие. ОКИ сопровождаются поражением различных отделов желудочно-кишечного тракта и характеризуются сходной клинической картиной с развитием диареи, тошнотой, рвотой, болями в области живота, лихорадкой и симптомами общей интоксикации. Путь передачи инфекций - фекально-оральный, реализующийся пищевым, водным или контактно-бытовыми путями; для вирусных гастроэнтеритов также возможен воздушно-капельный способ передачи. В связи с тем, что клиническая картина при различных ОКИ единообразна, точное определение возбудителя требует лабораторного подтверждения. Установление этиологии заболеваний позволяет оценить вероятность возникновения осложнений или тяжёлых форм болезни, подобрать оптимальную терапию для пациента и повысить эффективность противоэпидемических мероприятий. Метод ПЦР/ОТ-ПЦР - один из ключевых методов дифференциальной диагностики ОКИ, позволяющий выявлять также бессимптомные и хронические формы инфекций, контролировать процесс излечения.

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

Термофильная группа кампилобактерий. Кампилобактерии относятся к семейству *Campylobacteraceae*, роду *Campylobacter*. Основными возбудителями кишечного кампилобактериоза являются виды *C. jejuni* (*C. jejuni ssp. jejuni*, *C. jejuni ssp. doylei*), *C. coli*, *C. lari*, *C. helveticus* и *C. upsaliensis*, которые образуют генетически близкую группу и известны как термофильные кампилобактерии (термофильная группа кампилобактерий). Передача возбудителя человеку может осуществляться через птиц, диких, сельскохозяйственных и домашних животных, а также продукты питания и воду. Симптомы обычно появляются через 2–5 дней после инфицирования. Кампилобактериоз чаще протекает в виде гастроинтестинальной формы, также возможно стертое/бессимптомное течение. При сопутствующих патологиях заболевание может осложниться бактериемией с диссеминацией возбудителя в различные органы и ткани. После перенесенного кампилобактериального гастроэнтерита бактерии могут выделяться с фекалиями еще несколько недель. Помимо временного возможно хроническое бактерионосительство.

***Shigella spp.* и *EIEC* (энтероинвазивные *E.coli*).** Возбудители шигеллеза и энтероинвазивного эшерихиоза относятся соответственно к родам *Shigella* и *Escherichia* семейства *Enterobacteriaceae*. Важнейшим общим свойством этих бактерий является инвазивность. Патогены способны проникать в эпителиальные клетки кишечника и реплицироваться внутриклеточно, вызывая воспалительное разрушение кишечного эпителия, что проявляется характерным синдромом дизентерии: наличием крови, слизи и лейкоцитов в стуле. Общий фактор патогенности *Shigella spp.* и *EIEC* – наличие гена *ipaH* (основной ген инвазивного плазмидного антигена H) в составе большой хромосомной плазмиды *pINV*, характерной только для этих бактерий.

Резервуаром и источником *Shigella spp.* и *EIEC* является человек. Инфицирующая доза *EIEC* составляет 5×10^5 микробных клеток, что значительно выше, чем у *Shigella spp.* (10-200 клеток). Инкубационный период при энтероинвазивных эшерихиозах длится от 12 до 72 часов, при шигеллёзах несколько больше - от 1 до 7 дней. Шигеллёз может протекать в бессимптомной форме, субклинически, в форме хронической инфекции и бактерионосительства. В части случаев возможны осложнения после перенесенного заболевания. Инфекция, вызываемая *EIEC*, обычно протекает в более легкой форме.

Лечение бактериальных ОКИ включает поддерживающую терапию, направленную на восполнение потери жидкости и электролитов, а также антимикробные препараты.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК термофильной группы кампилобактерий, бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест-ОКИ ДНК *Campylobacter* (термофильная группа)/

Shigella spp. и ЕІЕС» предназначен для качественного выявления ДНК термофильной группы кампилобактерий, бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli* в биологическом материале человека (суспензии фекалий, ректальные мазки) методом, основанным на амплификации фрагмента ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Набор реагентов используется при диагностике кампилобактериозов и шигеллёзов/эшерихиозов у лиц с клиническими признаками кишечной инфекции (тошнота, рвота, диарея и т. д.) и для выявления бессимптомных носителей.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранных специфических фрагментов ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров на комплементарные последовательности, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Таq-полимеразой. Для детекции целевых нуклеиновых кислот в реакционной смеси используется набор олигонуклеотидов, специфичных к гену 16S рРНК термофильной группы кампилобактерий и гену *ipaH* бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивной группы *E.coli*.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение уровня флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение уровня флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данной ДНК гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи зонд расщепляется с 5'-конца, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Таq ДНК-полимеразы и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию уровня флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов, и динамика нарастания уровня флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителей инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения НК возбудителей инфекции из образцов клинического материала обеспечивается внутренним контрольным образцом (ВКО), который входит в состав наборов для выделения НК.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) Описание	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО)	1 пробирка, 1 мл

Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)	
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС) Лиофилизированная	96 пробирок
Оптическая плёнка	1,5 листа
Вкладыш со штрих-кодом	1 лист

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении НК из клинических образцов (суспензии фекалий, ректальные мазки), а также концентратов воды с использованием наборов для выделения нуклеиновых кислот «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест УниМаг» производства АО «Вектор-Бест».

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа с термоблоком для пробирок объемом 0,2 мл и каналами детекции: «ROX», «FAM», «HEX»: «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), «FLUORITE» (Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай) или их аналогами, зарегистрированными в установленном порядке в РФ.

Запуск программы амплификации и анализ результатов может производиться с помощью программного обеспечения «GP.РеалБест Диагностика» (размещено на сайте <http://www.vector-best.ru>).

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

Показания к применению.

Набор реагентов используется при диагностике кампилобактериозов и шигеллёзов/эшерихиозов у лиц с клиническими признаками кишечной инфекции (тошнота, рвота, диарея и т. д.) и для выявления бессимптомных носителей.

Противопоказаний к применению медицинского изделия нет (не применимо).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность

За аналитическую чувствительность принята величина концентрации целевой ДНК, для которой при экспериментальной проверке на двух сериях набора на 45 повторях для каждой серии и каждого из заявленных амплификаторов и наборов для выделения ДНК был получен положительный результат в 100% случаев.

Набор гарантированно выявляет ДНК термофильной группы кампилобактерий и бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli* в концентрации 100 копий в ПЦР-пробе (в 50 мкл выделенной РНК, что соответствует 4×10^3 копий ДНК/мл исходного образца), что контролируется при выпуске набора реагентов тестированием образцов, приготовленных из стандартных образцов предприятия с соответствующим содержанием бактериальной ДНК в ПЦР-пробе.

3.2. Аналитическая специфичность

Был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базам последовательностей микроорганизмов и вирусов, которые могут присутствовать в кишечном тракте человека (*Bacteroides spp.*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bifidobacteria spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, аденовирусы A-F). Возможность перекрестных реакций исключена.

Аналитическая специфичность набора реагентов подтверждена при исследовании ДНК следующих микроорганизмов (в концентрации не менее 1×10^4 копий/мл): *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Citrobacter spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, вирус папилломы человека 16 и 18, вирус гепатита В, цитомегаловирус, вирусы простого герпеса 1 и 2, аденовирусы.

3.3. Диагностическая чувствительность:

- диагностическая чувствительность выявления ДНК термофильной группы кампилобактерий: клинические испытания, проведенные на 54 положительных образцах, содержащих ДНК термофильной группы кампилобактерий, показали 100 % чувствительность (интервал 93,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- диагностическая чувствительность выявления ДНК бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli*: клинические испытания, проведенные на 54 положительных образцах, содержащих ДНК бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli*, показали 100 % чувствительность (интервал 93,4 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.4. Диагностическая специфичность:

- диагностическая специфичность выявления ДНК термофильной группы кампилобактерий: клинические испытания, проведенные на 203 отрицательных образцах, не содержащих ДНК термофильной группы кампилобактерий, показали 100 % специфичность (интервал 98,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

- диагностическая специфичность выявления ДНК бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli*: клинические испытания, проведенные на 203 отрицательных образцах, не содержащих ДНК бактерий рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli*, показали 100 % специфичность (интервал 98,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.5. Повторяемость и воспроизводимость

При тестировании на одной серии набора, на одном оборудовании, одним оператором, в одной лаборатории трёх образцов в 10 повторях каждый повторяемость составила 100%. Коэффициент вариации C_t не более 3,0 %.

При тестировании двумя операторами на двух сериях набора трёх образцов в 10 повторях каждый. межпостановочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов составила 100 %, коэффициент вариации C_t не более 4,0 %.

3.6. Потенциально интерферирующие вещества

Показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ при выделении НК с использованием набора реагентов «РеалБест УниМаг»: цельная кровь 0,625%, «СМОФлипид» 5%, билирубин 245 мкмоль/л, муцин 0,016%, «Элюфор» 2 мг/мл, «Энтеросгель» 3%, «Лоперамид» 0,125 мг/мл.

Показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ при выделении НК с использованием набора реагентов «РеалБест экстракция 100»: цельная кровь 5%, «СМОФлипид» 5%, билирубин 245 мкмоль/л, муцин 0,125%, «Элюфор» 1 мг/мл, «Энтеросгель» 3%, «Лоперамид» 0,125 мг/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению НК возбудителей ОКИ, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

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

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения НК и постановки ПЦР/ОТ-ПЦР согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

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

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

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

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

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Взятие и пробоподготовка исследуемого материала:

- контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортирования биологических образцов со шпателем объемом 30–50 мл, стерильный (например, ЗАО «Олданс», Россия);
- «Транспортный раствор (М)» (АО «Вектор-Бест», Россия);
- зонд урогенитальный тип А «Универсальный» (например, ООО «Юникорнмед», Россия);
- ПЦР-бокс (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия);
- центрифуга, обеспечивающая 3000 об/мин (например, «LMC-3000», BioSan, Латвия);
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Sartorius, Германия);
- штативы для пробирок вместимостью 10–15 мл (например SSI, США или аналогичный);

- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, Biohit, Финляндия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – МК-01», «КМ-ПРОЕКТ», Россия).

Амплификация:

- амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени планшетного типа (с термоблоком для пробирок объемом 0,2 мл и каналами детекции: «ROX», «HEX», «FAM»): «CFX96» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), «FLUORITE» (Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай) или аналогичный, зарегистрированный в установленном порядке в РФ;
- ПЦР-бокс (например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-"Ламинар-С", ЗАО «Ламинарные системы», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, Biohit, Финляндия);
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, Sartorius, Германия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», Ansell HealthCare, Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, SSI, США);
- контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – МК-01», КМ-ПРОЕКТ, Россия);
- нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов

6.1.1. Взятие, транспортирование и хранение исследуемых образцов

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат образцы биологического материала человека (суспензии фекалий, ректальные мазки).

Кроме того, набор может быть использован для исследования образцов концентратов воды.

Взятие, транспортировка и хранение образцов фекалий. Процедура может быть проведена пациентом самостоятельно либо сотрудником медицинского учреждения. Взятие образцов фекалий осуществляется с чистой поверхности, в качестве которой могут быть использованы лист бумаги, одноразовый полиэтиленовый пакет, одноразовая пластиковая тарелка и т. д. Для детей младшего возраста образцы фекалий забирают из одноразовых подгузников. Не допускается взятие образцов фекалий из ёмкостей многократного использования. Образец фекалий в количестве примерно 1 г (1 мл) одноразовыми наконечником, ложкой или шпателем переносят в специальный стерильный пластиковый контейнер либо с помощью стерильного зонда в пробирку с «Транспортным раствором (М)», как описано в п.6.1.2.

Хранение и транспортирование образцов фекалий перед ПЦР-анализом:

при температуре (18–26) °С – не более 6 часов;

при температуре (2–8) °С – не более 3 суток;

при температуре минус (18–40) °С – не более 1 недели.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Взятие, транспортировка и хранение ректальных мазков. Ректальный мазок может быть забран пациентом самостоятельно либо сотрудником медицинского учреждения. Ректальный мазок забирают стерильным зондом. Рабочую часть зонда вводят в прямую кишку на глубину около 1 см и производят им несколько аккуратных круговых движений. После чего зонд переносят в пробирку с «Транспортным раствором (М)» и тщательно ресуспендируют образец в растворе. Зонд извлекают из пробирки и утилизируют.

Хранение и транспортирование образцов ректальных мазков в «Транспортном растворе (М)»:

при температуре (18–26) °С – не более 6 часов;

при температуре (2–8) °С – не более 5 суток;

при температуре минус (18–40) °С – не более 1 месяца;

при температуре ниже минус 40 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Взятие, транспортировка и хранение образцов воды осуществляется согласно МУК 4.2.2029—05 «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов».

6.1.2. Подготовка исследуемых образцов к экстракции нуклеиновых кислот

Подготовка суспензий фекалий.

Суспензия может быть приготовлена в соответствии с МУ 1.3.2569-09 либо с использованием «Транспортного раствора (М)» (АО «Вектор-Бест», Россия). Для этого рабочую поверхность уrogenитального зонда полностью погружают в образец (при захвате избытка

образца, оставить избыток на стенке контейнера), после чего переносят зонд в пробирку с «Транспортным раствором (М)» и тщательно ресуспендируют образец в растворе. Зонд извлекают из пробирки и помещают в контейнер с дезинфицирующим раствором. Приготовленные суспензии выдерживают при комнатной температуре не менее 5 минут до оседания крупной взвеси и частиц. При необходимости пробирки центрифугируют при 3000 об./мин в течение 1 минуты. Для выделения нуклеиновых кислот используют 100 мкл полученной надосадочной жидкости.

Для приготовления суспензии из фекалий с полупрозрачной и водянистой консистенцией отобрать 100 мкл образца одноразовым наконечником и внести в пробирку с «Транспортным раствором (М)».

Внимание! Использование избытка образца фекалий при приготовлении суспензии, может привести к ингибированию реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Хранение образцов суспензий фекалий в «Транспортном растворе (М)»:

при температуре (18-26) °С – не более 6 часов;

при температуре (2–8) °С - не более 5 суток;

при температуре минус (18–40) °С – не более 1 месяца;

при температуре ниже минус 40 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Подготовка ректального мазка.

Пробирки с мазками выдерживают при комнатной температуре не менее 5 минут до оседания крупной взвеси и частиц. При необходимости пробирки центрифугируют при 3000 об./мин в течение 1 минуты. Для выделения нуклеиновых кислот используют 100 мкл полученной надосадочной жидкости.

Подготовка концентратов воды.

Концентраты образцов воды готовят согласно МУК 4.2.2029—05 «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов». Для выделения нуклеиновых кислот используют 100 мкл концентрата.

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

При использовании набора «РеалБест УниМаг», если из выделенной биопробы будет производиться более трех определений возбудителей инфекций, после элюции можно добавить в каждую лунку глубоколоночного планшета до 400 мкл элюирующего раствора дополнительно.

Выделенную НК хранить при температуре (2–8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18–26) °С не менее 30 минут.

Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: (1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

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

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

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Аккуратно удалить плёнку, закрывающую пробирки.

Внимание! При удалении плёнки следите, чтобы вместе с ней не была удалена ГРС.

В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК.

Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

7.3. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Внимание! Нельзя наносить на оптическую плёнку какие-либо надписи. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

Для повышения эффективности и скорости смешивания компонентов рекомендуется перемешать содержимое пробирок в мини-шейкере с частотой вращения 1200–1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

При использовании программного обеспечения прибора:

7.5. Запрограммировать прибор для проведения реакции ПЦР* (программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору):

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 94 °С – 1 минута;

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

*Возможно проведение анализа по программе для ОТ-ПЦР, использующейся в наборах серии РеалБест.

**Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации:

- «FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;
- «ROX» – для регистрации сигнала ДНК *Campylobacter* (термофильная группа);
- «HEX» – для регистрации сигнала ДНК *Shigella spp.* и EIEC.

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

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

При использовании программы «GP.РеалБест Диагностика»:

7.9. Запустить программное обеспечение «GP.РеалБест Диагностика».

7.10. Со вкладыша с информацией ввести данные штрих-кода набора.

7.11. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами.

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла Ct ВКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Campylobacter* (термофильная группа) (канал «ROX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Shigella spp.* и EIEC (канал «HEX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО.

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «ROX» и «HEX» с Ct, меньшим или равным 38. Если для ОКО значение Ct по каналам «ROX» и/или «HEX» меньше или равно 38, то это свидетельствует о наличии контаминации. Порядок действий в таком случае см. в п. 8.2.4.

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

8.2. Учёт результатов.

8.2.1. Вычислить $(Ct\ ВКО)_{ср}$ как среднее значение Ct ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения Ct ВКО, отличающиеся более чем на 2,0 от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$. После отбраковки пересчитать $(Ct\ ВКО)_{ср}$ для оставшихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий ДНК *Campylobacter* (термофильная группа), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 38 или не определяется. Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2,0, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

Анализируемый образец учитывается как отрицательный (не содержащий ДНК *Shigella spp.* и EIEC), если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» больше 38 или не определяется. Если для такого образца значение Ct ВКО отличается от значения $(Ct\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2,0, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

8.2.3. Анализируемый образец учитывается как положительный, т. е. содержащий ДНК *Campylobacter* (термофильная группа), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 38.

Анализируемый образец учитывается как положительный, т. е. содержащий ДНК *Shigella spp.* и EIEC, если для этого образца значение Ct по каналу «HEX» меньше или равно 38.

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

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

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

9.3. Срок годности набора – 18 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

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

Инструкция по применению и паспорт размещены на сайте <http://www.vector-best.ru>.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-ОКИ ДНК *Campylobacter* (термофильная группа)/ *Shigella* spp. и ЕИЕС», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел. (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс (383), 252-51-81, 252-51-77.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

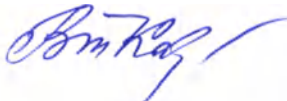
ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

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

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

 А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

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

 Т.И. Поспелова

М.П.



Пропиновано, пронумеровано и
скреплено печатью 15 листов.

Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

 Захарова Л.Н.

"12" 04 20 23 г.

