

«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

В.Г. Акимкин

« 12 » марта 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для диагностики in vitro

АмплиСенс® *Rickettsia conorii*-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..... 7

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ 7

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 11

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.. 14

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК..... 16

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..... 18

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 18

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 19

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN)..... 20

 СОСТАВ 20

 АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .. 20

 А. Подготовка пробирок для амплификации 20

 Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» .. 21

 В. Анализ и интерпретация результатов 23

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L) 26

 СОСТАВ 26

 АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» .. 26

 А. Подготовка пробирок для амплификации 26

 Б. Проведение ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»..... 27

 В. Анализ и интерпретация результатов 28

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 31

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 33

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. 34

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеотидтрифосфат
K+	- положительный контроль ПЦР
K–	- отрицательный контроль ПЦР
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® *Rickettsia conorii*-FL, далее – набор реагентов, предназначен для качественного определения ДНК *Rickettsia conorii* в биологическом материале (кровь, тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал, смывы с очага первичного аффекта, 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 клещевую пятнистую лихорадку (клещевой риккетсиоз) 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 клинко-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 *R.conorii* 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 *R.conorii*, а также амплификация последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации ДНК *R.conorii*, а также ДНК ВКО-FL регистрируются по 2 различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>R.conorii</i>
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	ompA 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 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, 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, 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

Вид исследуемого материала	Объем образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий /мл
Смыв с первичного аффекта	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10 ³
Клещи	100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10 ³
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

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании следующих штаммов микроорганизмов: флавивирусов: *WNV* (вирус Западного Нила), *JEV* (вирус японского энцефалита), *OHFV* (вирус омской геморрагической лихорадки), *TBEV* (вирус клещевого энцефалита), *Bartonella henselae*, *Anaplasma phagocytophillum*, *Babesia microti*, *Leptospira kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *Shigella sonne*, *S. flexneri*, *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, *Klebsiella pneumonia*, *Esherichia coli* NCTC 9001, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia pestis*, 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.

Таблица 3

Результаты тестирования набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Rickettsia conorii*-FL в сравнении с референтными методами

Тип образцов	Результаты исследования набора реагентов АмплиСенс® <i>Rickettsia conorii</i> -FL		Результат сравнения с референтным методом выявления специфических антител ¹		Результат сравнения с референтным методом секвенирования ²	
			положительных	отрицательных	положительных	отрицательных
Кровь	Всего исследовано 198 образцов	положительных	132	0	132	0
		отрицательных	66	0	0	66
Смыв с первичного аффекта	Всего исследовано 52 образца	положительных	44	0	44	0
		отрицательных	8	0	0	8

Для оценки диагностической чувствительности были использованы:

- 198 образцов бактериального осадка крови от пациентов с диагнозом «Астраханская риккетсиозная лихорадка». Диагноз был подтвержден на основании клинических симптомов: лихорадка, сыпь, первичный аффект, регионарный лимфаденит, и наличия сероконверсии специфических антител, определенных с помощью набора реагентов для диагностики in vitro IgG/IgM-антитела к *Rickettsia conorii* («Вирсел, Л.С.», Испания).
- 52 образца смывов с первичного аффекта, полученных от 52 пациентов из вышеописанной группы.

Таблица 4

Результаты тестирования набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Rickettsia conorii*-FL при исследовании материала от пациентов с иной этиологией заболевания и клещей, собранных с незндемичной по *R.conorii* территории

Тип образцов	Результаты исследования набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® <i>Rickettsia conorii</i> -FL		Материал от пациентов с иной этиологией заболевания и клещей, собранных с незндемичной по <i>R.conorii</i> территории	
			положительных	отрицательных
Кровь	Всего исследовано 25 образцов	положительных	0	0
		отрицательных	0	25
Смыв с первичного аффекта	Всего исследовано 25 образцов	положительных	0	0
		отрицательных	0	25
Ликвор	Всего исследовано 25 образцов	положительных	0	0
		отрицательных	0	25

¹ В качестве референтного метода использовался набор реагентов для диагностики in vitro IgG/IgM-антитела к *Rickettsia conorii* («Вирсел, Л.С.», Испания) РУ № ФСЗ 2009/05430 от 29 октября 2014 года

² Проведено секвенирования методом Сэнгера участка ДНК длиной 170-176 н.п. из биологических проб на приборе ABIPrism 3100.

Тип образцов	Результаты исследования набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® <i>Rickettsia conorii</i> -FL		Материал от пациентов с иной этиологией заболевания и клещей, собранных с неэндемичной по <i>R.conorii</i> территории	
			положительных	отрицательных
Тканевой (биопсийный, аутопсийный) материал	Всего исследовано 25 образцов	положительных	0	0
		отрицательных	0	25
Клещи	Всего исследовано 25 образцов	положительных	0	0
		отрицательных	0	25

Для оценки диагностической специфичности были использованы образцы осадков крови, ликвора, тканевого (биопсийного, аутопсийного) материала, смывов с первичного аффекта, полученных от пациентов с иной этиологией заболевания (по 25 образцов каждого вида биологического материала), а также на 25 образцах клещей *D.reticulatus*, собранных на неэндемичной по *R.conorii* территории.

Таблица 5

Результаты анализа модельных образцов ликвора, аутопсийного материала, клещей, контаминированных штаммом *R.conorii* М-1

Вид исследуемого материала	Объем исследуемого образца, мкл	Концентрация ДНК <i>R.conorii</i> М-1 в образце, копий/мл	Комплект реагентов для экстракции ДНК	Число контаминированных образцов	Число положительных результатов	%
Аутопсийный материал	100	1х10 ³	«РИБО-преп»	20	20	100
Ликвор	100	1х10 ³	«РИБО-преп»	20	20	100
Клещи	100	1х10 ³	«РИБО-преп»	20	40	100
	100	1х10 ³	«МАГНО-сорб»	20		

Для оценки диагностической чувствительности набора реагентов при исследовании видов материалов, для которых нет репрезентативной выборки от больных риккетсиозом, вызванным *R.conorii*, а также при исследовании клещей испытание проводили с использованием модельных образцов биологического материала, контаминированного штаммом *R.conorii* М-1 в концентрации 10³ коп/мл.

Диагностические характеристики набора реагентов для диагностики
in vitro АмплиСенс® *Rickettsia conorii*-FL

Тип образцов	В сравнении с референтным методом выявления специфических антител ³	При исследовании материала от больных с иной этиологией заболевания и от клещей, собранных на эндемичной территории	В сравнении с референтным методом секвенирования ⁴	При исследовании модельных образцов ⁵
	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %) в интервале, %	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95 %) в интервале, %	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %) в интервале, %	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95 %) в интервале, %
Кровь	59,6-73,2	86,3-100	97,2-100	—
Смывы с первичного аффекта	71,9-93,1	86,3-100	92-100	—
Ликвор	—	86,3-100	—	84,6-100
Тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал.	—	86,3-100	—	84,6-100
Клещи	—	86,3-100	—	84,6-100

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

³ В качестве референтного метода использовался набор реагентов для диагностики in vitro IgG/IgM-антитела к *Rickettsia conorii* («Вирсел, Л.С.», Испания) РУ № ФСЗ 2009/05430 от 29 октября 2014 года

⁴ Проведено секвенирования методом Сэнгера участка ДНК длиной 170-176 н.п. из биологических проб на приборе ABIPrism 3100.

⁵ Модельные образцы ликвора, аутопсийного материала и клещей, контаминированных штаммом *R.conorii* М-1 в концентрации 10³ коп/мл

паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с 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, упаковку⁶, 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 фильтром⁷. 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.

⁶ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

⁷ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с 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. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) для взятия смывов с первичного аффекта.
6. 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

7. 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.
8. 96 % раствор этанола для проведения пробоподготовки клещей.
9. Глицерол для хранения обработанных клещей.
10. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 и 2,0 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. Заворачивающиеся крышки к пробиркам (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
12. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, и до 1000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
13. Штативы для пробирок объемом 1,5 и 2,0 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
14. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала и клещей.
15. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
16. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
17. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления

надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).

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

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

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

21. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

22. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265) или другие рекомендованные Производителем.

23. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

24. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neon 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) и другие, рекомендованные Производителем).

25. Набор реагентов (например, «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265)) и набор расходных материалов к автоматической станции.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

26. 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.

27. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до

- 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
- 28.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).
- 29.Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
- 30.Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
- 31.Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
- 32.Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 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).
- 33.Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
- 34.Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
- 35.Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- кровь,
- тканевой (аутопсийный, биопсийный) материал,
- ликвор,
- смывы с первичного аффекта,
- клещи.

Кровь

Для получения бактериального осадка крови 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 6 % раствором ЭДТА (конечная концентрация после забора крови составляет 0,3 %) или 3,2 % раствором цитрата натрия в качестве антикоагулянта. После взятия крови пробирку следует несколько раз плавно перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтom. (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 лейкоцитов 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, 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.

Смывы с первичного аффекта

Материал забирают нестерильным ватным тампоном на пластиковой основе (зонд). Тампон предварительно смачивают в физиологическом растворе и проводят движением с легким нажимом по участку кожи с первичным аффектом. Затем рабочую часть зонда с ватным тампоном помещают в одноразовую пробирку с защелкивающейся или завинчивающейся крышкой, содержащей 300 мкл физиологического раствора, и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части зонда так, что тампон вместе с материалом остается в пробирке в физиологическом растворе. Пробирку плотно закрывают.

Допускается хранение материала до проведения ПЦР-исследования:

- 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.

Клеши

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 ЭКСТРАЦИИ 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 крови 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 тканевого (аутопсийного, биопсийного) материала требуют предварительной подготовки.

Для экстракции ДНК берут 30-50 мг (мкл) материала и гомогенизируют его растиранием с использованием предварительно охлаждённых стерильных фарфоровых ступок и пестиков или с помощью гомогенизатора. Из растёртой ткани готовят 10 % суспензию на охлаждённом 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.

Смывы с первичного аффекта не требуют предварительной обработки.

Клещи требуют предварительной подготовки.

При исследовании пулов голодных клещей семейства *Ixodidae* число особей в одном пуле не должно превышать 3, напитавшихся клещей надо 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 центрифугировать на вортексе. Удалить надосадочную жидкость отдельным наконечником без фильтра, используя вакуумный отсасыватель. Перенести клещей в стерильную фарфоровую чашку (или гомогенизатор), добавить **600 мкл** (при исследовании 1 голодного клеща) или **1 мл** (если гомогенизируют

напитавшегося клеща или 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), 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 гибридационно-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 лейкоцитов крови, ликвора, клещей, тканевого (аутопсийного и биопсийного) материала и смывов с первичного аффекта 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 лейкоцитов 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 иксодовых 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 *Rickettsia conorii* 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-FL <i>Rickettsia conorii</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
К+ <i>Rickettsia conorii</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

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 *Rickettsia conorii* 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 *Rickettsia conorii*. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.

3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество: ПЦР-смеси-FL *Rickettsia conorii* 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+ *Rickettsia conorii***.
 - 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. 6, 7)⁸.

⁸ Предпочтительнее использовать программу амплификации в таблице 7, при отсутствии необходимости использовать единую программу амплификации.

Таблица 6

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, JOE	

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 *Rickettsia conorii*, 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 7

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, JOE	

2. 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.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного

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

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

сигнала.

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 8

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Rickettsia conorii</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 9

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (<i>Ct</i>)		Результат
FAM	JOE	
определено меньше граничного	отсутствует	ДНК <i>Rickettsia conorii</i> НЕ обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>Rickettsia conorii</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. 10 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 10

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла (*Ct*) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE 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 JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). 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 (К–) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE определено значение порогового цикла (*Ct*). 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 амплификации фрагмента ДНК *Rickettsia conorii* 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>Rickettsia conorii</i> -Lyo	Порошок белого цвета	–	48 пробирок объемом 0,2 мл
K+ <i>Rickettsia conorii</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 *Rickettsia conorii*-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.

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

3. Поставить контрольные реакции.

- а) **положительный контроль ПЦР (K+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл K+ *Rickettsia conorii***
- б) **отрицательный контроль ПЦР (K-)** – в пробирку с реакционной смесью внести **25 мкл K–**.
- 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.11, 12)¹¹.

Таблица 11

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного¹² и планшетного¹³ типа

Цикл	Температура, °С	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, JOE	

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 *Rickettsia conorii*, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции

¹¹Предпочтительнее использовать программу амплификации в таблице 12, при отсутствии необходимости использовать единую программу амплификации.

¹² Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие рекомендованные Производителем.

¹³ 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 12

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, JOE	

2. 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.

3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

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 13

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующая о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО-FL	ДНК <i>Rickettsia conorii</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 14

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		Результат
FAM	JOE	
определено меньше граничного	отсутствует	ДНК <i>Rickettsia conorii</i> НЕ обнаружена
определено или отсутствует	определено меньше граничного	ДНК <i>Rickettsia conorii</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. 15 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 15

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		FAM	JOE
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 (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или JOE 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 JOE 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 JOE 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 *Rickettsia conori* и ПЦР-буфера-Н. ПЦР-смесь-FL *Rickettsia conorii*, ПЦР-буфер-Н хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-FL *Rickettsia conorii* 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 *Rickettsia conorii*-Lyo 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.ru¹².

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1» УДП РФ



Е.В. Ржевская

¹² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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».

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки проб).

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, 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.

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 35 лист 06

Заместитель директора по эпидемиологии - Врио
директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора




В.Г. Акимкин