

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный научно-
исследовательский институт эпидемиологии»
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека



А.В. Горелов

« 18 » декабря 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-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.....	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	10
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	12
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	16
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	18
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	20
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	21
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	22
ФОРМА 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN)	23
СОСТАВ	23
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	23
А. Подготовка проб для амплификации	23
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	25
В. Анализ и интерпретация результатов.....	26
ФОРМА 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L).....	30
СОСТАВ	30
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	30
А. Подготовка проб для амплификации	30
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» ..	31
В. Анализ и интерпретация результатов	33
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	36
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	37
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	38
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	39

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87	- экзогенный внутренний контрольный образец
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	- дезоксирибонуклеозидтрифосфат
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
КПЛ (SFG)	- группы клещевых пятнистых лихорадок (Spotted Fever Group)
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РУ	- регистрационное удостоверение
ТЦПД ₅₀	- титр вируса, выраженный в тканевых цитопатических дозах
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 АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-FL предназначен для диагностики и профилактики заболеваний, вызванных группой клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ), *Rickettsia Spotted fever group* (SFG), путем качественного определения ДНК *Rickettsia* spp. в биологическом материале (лейкоциты крови, тканевой материал, смывы с очага первичного аффекта, ликвор, клещи) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные 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 в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала,

полученного от лиц с подозрением на клещевую пятнистую лихорадку (клещевой риккетсиоз) вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, а также для исследования 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 клиничко-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 совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО STI-87) и одновременной амплификации участков ДНК *Rickettsia* spp. SFG и ДНК ВКО STI-87 с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО STI-87 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 амплификация участков ДНК при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридируются 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 помощью амплификатора 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 *Rickettsia* spp. SFG и амплификация последовательности ВКО STI-87. Результаты амплификации ДНК *Rickettsia* spp. SFG и ДНК ВКО STI-87 регистрируются по двум различным каналам флуоресцентной детекции:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE
ДНК-мишень	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Rickettsia</i> spp. SFG
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	Omb ген

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

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

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-L

Формы 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.

Форма 1 рассчитана на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли. Форма 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 ¹
Цельная кровь	Осадок+100	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN, FRT-L	10 ³
Тканевой 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
Смывы 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

Набор реагентов обнаруживает участки ДНК заявленных микроорганизмов. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании следующих микроорганизмов/штаммов:

¹ Количество копий микроорганизма в 1 мл образца исследуемого материала.

Таблица 3

Возбудитель	Штамм	Концентрация
<i>Japanese encephalitis virus (JEV)</i>	Pekin-1	Титр 10^6 ТЦПД ₅₀ /мл
<i>Leptospira kirschneri</i> (серогруппа <i>kirshnen</i>)	Moskva V	Не менее 10^7 ГЭ/мл
<i>Leptospira</i> spp (серогруппа <i>Borgpetersenii</i>)	Poi	
<i>Tick-borne encephalitis virus (TBEV)</i>	Комарово	
<i>Borrelia miyamotoi</i>	Izh-4	
<i>West Nile virus (WNV)</i>	Leiv-VLG99-27889 human	
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC® 1721	
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC® 851b (1270)	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>Braenderup</i>	ATCC® BAA-664	
<i>Escherichia coli</i> O104H4	ATCC® BAA-2326™	
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 29212™	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® 27736™	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 29213™	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC® 49907™	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 15442™	
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453™	
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC® 13047™	

Примечание – ATCC (American Type Culture Collection, США) – американская коллекция типовых культур.

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, а также ДНК цельной крови людей, не бывавших в эндемичных по риккеттсиозам регионах, ДНК клещей и ДНК грызунов, неспецифических реакций выявлено не было.

Информация об интерферирующих соединениях указана в разделе «Интерферирующие вещества и ограничения по использованию проб исследуемого материала».

Повторяемость и воспроизводимость исследования

Повторяемость и воспроизводимость исследования были определены путем тестирования положительных и отрицательных модельных образцов. Положительный образец представлял собой стандартный образец предприятия, содержащий ДНК *Rickettsia* spp. SFG в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл, в качестве отрицательного образца был использован

реагент ОКО.

Условия повторяемости включали в себя тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Условия воспроизводимости – тестирование в двух независимых лабораториях, разными операторами, в разные дни, на различных приборах. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	20	100
Отрицательные	10	100	20	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы следующие образцы (см. табл. 5):

Таблица 5

Вид исследуемого материала	Количество образцов
Цельная кровь от пациентов с клиническим диагнозом «Клещевой риккетсиоз»	260
Цельная кровь от пациентов с иными лабораторно подтвержденными диагнозами	50
Смывы с первичного аффекта от пациентов с клиническим диагнозом «Клещевой риккетсиоз»	90
Смывы с пораженных участков кожи от пациентов с иной этиологией заболевания	50
Биопсийный материал из первичных аффектов от пациентов с клиническим диагнозом «Клещевой риккетсиоз»	19
Аутопсийный материал от пациентов с иной этиологией заболевания	50
Суспензии клещей ²	245
Ликвор от пациентов с иной этиологией заболевания	25
Ликвор от пациентов с иной этиологией заболевания, контаминированный штаммом ³ <i>Rickettsia sibirica</i> Нецветаев в концентрации 10 ³ копий/мл	25
Всего	814

² Клещи из регионов, эндемичных по клещевому риккетсиозу.

³ Коллекция Омского НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора.

Таблица 6

**Результаты тестирования набора реагентов
АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-FL в сравнении с
референтным методом**

Вид исследуемого материала	Результаты применения АмплиСенс® <i>Rickettsia</i> spp. SFG-FL	Результаты применения референтного метода ⁴	
		положительных	отрицательных
Цельная кровь	Всего исследовано 310 образцов	положительных	185
		отрицательных	3
Смывы с первичного аффекта и других поражений кожи	Всего исследовано 140 образцов	положительных	2
		отрицательных	120
Тканевой материал (биопсийный и аутопсийный)	Всего исследовано 69 образцов	положительных	87
		отрицательных	2
Клещи	Всего исследовано 245 образцов	положительных	19
		отрицательных	0
Ликвор	Всего исследовано 50 образцов	положительных	102
		отрицательных	2
		положительных	1
		отрицательных	140
		положительных	25
		отрицательных	0
		положительных	0
		отрицательных	25

Таблица 7

**Диагностические характеристики набора реагентов
АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-FL**

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ⁵ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ⁶ (с доверительной вероятностью 95 %)
Цельная кровь	98,9 (97,4 – 100) %	97,5 (94,7 – 100) %
Смывы с первичного аффекта и других поражений кожи	98,8 (96,5 – 100) %	96,0 (90,7 – 100) %
Тканевой материал (биопсийный и аутопсийный)	100 (86,0 – 100) %	100 (94,2 – 100) %
Ликвор	100 (88,7 – 100) %	100 (88,7 – 100) %
Клещи	99,0 (97,1 – 100) %	98,5 (96,5 – 100) %

⁴ В качестве референтного метода использовался набор реагентов РеалБест ДНК *Rickettsia species*, АО «Вектор-Бест», Россия, (ПУ № РЗН 2017/6276).

⁵ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

⁶ Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

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 от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с 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, упаковку⁷,

⁷ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

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 фильтром⁸. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не 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

⁸ Для удаления надсадочной жидкости с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

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 реагентов 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 типа 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, Gebruder Martin GmbH & Co. KG («Гебрюдер Мартин ГмбХ & Ко. КГ»), Германия, или аналогичные).

4. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия, или аналогичный).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) для взятия смывов с первичного аффекта.
7. 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

8. 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.
9. 96 % раствор этанола для проведения пробоподготовки клещей, обработанных маслом.
10. Глицерин для хранения обработанных клещей.
11. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
12. Закручивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
13. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200, и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
14. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
15. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала и клещей.
16. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с

максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).

17. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
18. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
19. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
20. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
21. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
22. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

23. Комплект реагентов для экстракции ДНК – «РИБО-преп» (РУ ФСР 2008/03147), «МАГНО-сорб» (РУ ФСР 2010/07265) или другие, рекомендованные Изготовителем.
24. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

25. Автоматическая станция для экстракции НК (например, Neop 100 (Xiril AG (Ксирил АГ), Швейцария) и другие, рекомендованные Изготовителем).
26. Комплект реагентов для экстракции ДНК (например, «МАГНО-сорб» (РУ № ФСР 2010/07265)) и набор расходных материалов к автоматической станции.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

27. Одноразовые полипропиленовые пробирки при работе с «ПЦР-комплексом» вариант FRT-50 FN:
 - а) закручивающиеся 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.

- 28. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
- 29. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
- 30. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
- 31. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
- 32. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
- 33. 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 Изготовителем).
- 34. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
- 35. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
- 36. Емкость для сброса наконечников.
- 37. ПО для автоматической обработки результатов,

зарегистрированное в установленном порядке.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- цельная кровь,
- тканевой материал,
- клещи,
- ликвор,
- смывы с первичного аффекта.

Цельная кровь

Для получения бактериального осадка крови взятие цельной крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в пробирку (специальная вакуумная система) с 6 % раствором ЭДТА (конечная концентрация после забора крови составляет 0,3 %) или с 3,2 % раствором цитрата натрия в качестве антикоагулянта. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. (В противном случае кровь свернется, и экстракция ДНК станет невозможной!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Допускается хранение образцов цельной крови до проведения предобработки:

- 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 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 в пробирку объемом 2,0 мл. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Допускается хранение образцов тканевого материала:

- при температуре от 20 до 25 °С – 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.

Клещи

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

Допускается хранение материала после разбора и формирования проб:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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 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 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, чтобы тампон вместе с материалом остался в пробирке в физиологическом растворе. Пробирку плотно закрывают.

Допускается хранение материала до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 20 до 25 °С – 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.

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК

Бактериальный осадок крови требует предварительной подготовки.

Перенести 1,5 мл крови с раствором ЭДТА, используя наконечник с фильтром, в стерильную одноразовую пробирку объемом 2,0 мл. Центрифугировать 10 мин 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 вместе со 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.

Тканевой материал требует предварительной подготовки.

Для экстракции ДНК взять 30-50 мг (мкл) материала и гомогенизировать его растиранием с использованием предварительно охлаждённых стерильных фарфоровых ступок и пестиков или с помощью гомогенизатора. Из растёртой ткани

приготовить 10% суспензию на охлажденном 0,9% растворе натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатном буферном растворе (PBS). Для этого на 1 объем растёртой ткани добавить 9 объемов физиологического раствора или фосфатного буфера. 100 мкл полученной суспензии использовать для экстракции ДНК.

Допускается хранение предварительно обработанных образцов тканевого 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.

Клещи требуют предварительной подготовки.

При исследовании пулов голодных клещей семейства *Ixodidae* число особей в одном пуле не должно превышать 3, напивавшихся 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 осадить 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 напивавшегося 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 внести глицерол (10% по объему оставшейся суспензии), пробу перемешать и заморозить 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 однократное замораживание-оттаивание материала.

Ликвор требует предварительной подготовки.

1-1,5 мл ликвора центрифугировать при 10 тыс g (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги типа «Эппендорф») в течение 10 мин. Отобрав надосадочную жидкость в контейнер для утилизации отходов, оставив 100 мкл. Для экстракции ДНК взять 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 подготовки.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

Для контроля эффективности экстракции ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов ДНК ВКО STI-87, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и

отсутствии ингибиторов ПЦР.

Потенциально интерферирующие вещества

Для оценки потенциальной интерференции были выбраны эндогенные и экзогенные вещества, которые могут присутствовать в биологическом материале (цельная кровь), используемом для исследования.

Были протестированы образцы цельной крови без добавления и с добавлением эндогенных (гемоглобин, билирубин, холестерин, триглицериды) и экзогенных (литий гепарин и калий ЭДТА) потенциально интерферирующих веществ (см. табл. 8).

Тестирование проводили на образцах бактериального осадка крови с добавлением стандартного образца предприятия *Rickettsia* spp. SFG с концентрацией 1×10^4 ГЭ/мл.

Таблица 8

Вид потенциального интерферента	Потенциальный интерферент	Протестированная концентрация в образце	Наличие интерференции
Эндогенные вещества	Гемоглобин	250 г/л (верхняя граница нормы – 170 г/л)	Не обнаружено
	Общий билирубин	210 мкмоль/л (верхняя граница нормы – 21 мкмоль/л)	Не обнаружено
	Общий холестерин	78 ммоль/л (верхняя граница нормы – 7,8 ммоль/л)	Не обнаружено
	Триглицериды	37,0 ммоль/л (верхняя граница нормы – 3,7 ммоль/л)	Не обнаружено
Экзогенные вещества ⁹	Литий гепарин	от 12 до 30 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>
	Калий ЭДТА	2,0 мкг/мл	Не обнаружено

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

⁹ В соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 (Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа) калия ЭДТА используют в концентрации от 1,2 до 2,0 мг/мл, лития гепарин – в концентрации от 12 до 30 МЕ/мл.

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

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО STI-87.

Объем ВКО STI-87 – 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 материала, суспензии иксодовых клещей – 100 мкл суспензии.

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

Объем элюции:

- 50 мкл (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 FN);
- 100 мкл (при проведении амплификации с использованием «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L).

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

Экстракция ДНК из каждого исследуемого образца и контролей проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО STI-87.

Объем ВКО STI-87 – 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 1 («ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN)**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 FN – комплект реагентов для амплификации участка ДНК *Rickettsia* spp. SFG 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</i> spp. SFG	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</i> spp. SFG	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

АМПЛИФИКАЦИЯ 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 проб 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* spp. SFG и 5 мкл ПЦР-буфера-Н. Смесь готовить на общее число

исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 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 spp. SFG* и ПЦР-буфером-Н. Перемешать содержимое всех реагентов ПЦР-комплекта, осадить капли на вортексе.
3. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-FL *Rickettsia spp. SFG* 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.

7. Поставить контрольные реакции.

- а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести 10 мкл К+ *Rickettsia spp. SFG*.
- 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. 9, 10)¹⁰.

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Таблица 9

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов роторного¹¹ и планшетного¹² 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* spp. SFG, 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.

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

¹¹ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

¹² Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

Таблица 10

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹¹ и планшетного¹² 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 рекомендуется 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

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме, с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

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 двум каналам:

Таблица 11

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Rickettsia</i> spp. SFG

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или

отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (C_t) в соответствующей графе таблицы результатов. Принцип интерпретации результатов следующий:

Таблица 12

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		Результат
FAM	JOE	
определено меньше граничного	отсутствует	ДНК <i>Rickettsia</i> spp. SFG НЕ обнаружена
определено или отсутствует	определено меньше граничного	ДНК <i>Rickettsia</i> spp. SFG обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
определено меньше граничного	определено больше граничного	Сомнительный**

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

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

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

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

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)	
		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 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 (Ct). 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 (Ct), 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 2 («ПЦР-комплект» вариант FRT-L)**СОСТАВ**

«ПЦР-комплект» вариант FRT-L – комплект реагентов для амплификации участка ДНК *Rickettsia* spp. SFG 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</i> spp. SFG-Lyo	Порошок белого цвета	–	48 пробирок объемом 0,2 мл
K+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

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

АМПЛИФИКАЦИЯ 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 проб 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* spp. SFG-Lyo для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в пункте 3).
2. В подготовленные пробирки внести по 25 мкл проб ДНК,

полученных в результате экстракции из исследуемых образцов.

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

3. Поставить контрольные реакции:

- а) положительный контроль ПЦР (K+) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл K+ *Rickettsia* spp. SFG.
- б) отрицательный контроль ПЦР (K–) – в пробирку с реакционной смесью внести 25 мкл K–.
- в) отрицательный контроль экстракции (OK) – 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.

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. 14, 15)¹³.

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

¹³ Предпочтительнее использовать программу амплификации в таблице 15, при отсутствии необходимости использовать единую программу амплификации.

Таблица 14

**Единая программа амплификации и детекции
флуоресцентного сигнала «АмплиСенс» для приборов
роторного¹⁴ и планшетного¹⁵ 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* spp. SFG, 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.

Таблица 15

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного¹⁴ и планшетного¹⁵ 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	

- 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 рекомендуется дополнительно установить

¹⁴ Например, Rotor-Gene Q (QIAGEN) и другие, рекомендованные Изготовителем.

¹⁵ Например, CFX 96 (Bio-Rad) и другие, рекомендованные Изготовителем.

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

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме, с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

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 двум каналам:

Таблица 16

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Rickettsia</i> spp. SFG

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

Таблица 17

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (C_t)		Результат
FAM	JOE	
определено меньше граничного	отсутствует	ДНК <i>Rickettsia</i> spp. SFG НЕ обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	ДНК <i>Rickettsia</i> spp. SFG обнаружена
отсутствует или определено больше граничного	отсутствует или определено больше граничного	Невалидный*
определено меньше граничного	определено больше граничного	Сомнительный**

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

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

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

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для контролей этапов экстракции и амплификации ДНК в соответствии с табл. 18 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 18

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

Возможные ошибки:

1. Для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла (C_t) по каналам для флуорофоров FAM и/или 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 (OK) 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 (C_t), 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. 15 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.

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

Хранение.

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

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *Rickettsia* spp. SFG-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель 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.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcg.ru¹⁶.

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 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»
Управления делами Президента
Российской Федерации

Е.В. Ржевская

¹⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель 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.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru¹⁶.

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 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»
Управления делами Президента
Российской Федерации



Е.В. Ржевская

¹⁶ 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».

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 STI-87, 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 STI-87, 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 STI-87, 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 мкл 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.

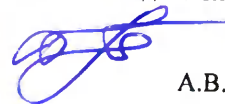
- 11.Добавить в пробирки по 700 мкл раствора для отмывки 5.
- 12.Смыть магнетизированную силику вортексированием, а затем осадить капли кратким центрифугированием.
- 13.Поставить пробирки в обычный штатив, открыть крышки и переставить в магнитный штатив. Инкубировать 2 мин.
- 14.Отобрать надосадочную 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 °С 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 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для этого необходимо, не захватывая магнетизированную силику, перенести надосадочную жидкость в новую пробирку.

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 40
сорок лист сб

Заместитель директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



А.В. Горелов

20 19 г.





Инструкция по применению набора
реагентов расположена на сайте
www.amplisens.ru



Краткое руководство

набор реагентов АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-FL

Форма 1: **REF** H-3741-1

Форма 2: **REF** H-3742-1-4



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



VER 01.08.19

ВНИМАНИЕ! Краткое руководство предназначено для удобства работы с набором реагентов в лаборатории и может быть использовано только после детального ознакомления с инструкцией по применению данного набора реагентов. Анализ и интерпретацию результатов необходимо проводить в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Комплекты для экстракции:

«РИБО-преп» для экстракции ДНК из лейкоцитов крови, ликвора, клещей, тканевого материала и смывов с первичного аффекта;

– «МАГНО-сорб» для экстракции ДНК из клещей;

– другие комплекты, рекомендованные Изготовителем.

Контроли: Внутренний контрольный образец (ВКО STI-87) – в каждом образце.

Для каждой группы экстрагируемых образцов: 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «РИБО-преп» добавить:

ВКО STI-87	10 мкл	в каждую пробирку
Кровь и ликвор	осадок и 100 мкл надосадочной жидкости	в пробирки для исследуемых образцов
Тканевой материал; суспензия иксодовых клещей	100 мкл	
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция		
все образцы	50 мкл	в каждую пробирку (для формы 1)
	100 мкл	в каждую пробирку (для формы 2)

Объем исследуемого образца, контролей и элюции

При экстракции с помощью «МАГНО-сорб»¹ добавить:

ВКО STI-87	10 мкл	в каждую пробирку
Суспензия иксодовых клещей	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК
Элюция		
все образцы	100 мкл	в каждую пробирку

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-50 FN

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (10 мкл).

Контроли: 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроли ПЦР, 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления реакционной смеси.
- Разморозить пробирки с ПЦР-смесью-FL *Rickettsia* spp. SFG и ПЦР-буфером-Н.
- В отдельной пробирке подготовить реакционную смесь.

Компонент реакционной смеси	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь-FL <i>Rickettsia</i> spp. SFG	10*(N+K+1)	N – количество исследуемых образцов; K – количество контролей; 1 – запас
ПЦР-буфер-Н	5*(N+K+1)	

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

- Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации исследуемых и контрольных проб.

Внести по 15 мкл

Приготовленной реакционной смеси	в каждую пробирку
----------------------------------	-------------------

Внести по 10 мкл

Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК <i>При проведении экстракции методом магнитной сепарации необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	
K+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG	в пробирку для K+
K-	в пробирку для K-

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.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ «ПЦР-комплекта» вариант FRT-L

Общий объем реакционной смеси: 25 мкл, включая объем пробы ДНК (25 мкл).

Контроли: 1 положительный (K+) и 1 отрицательный (K-) контроли ПЦР, 1 отрицательный контроль экстракции (ОК).

- Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации с готовой лиофилизированной реакционной ПЦР-смесью *Rickettsia* spp. SFG-Lyo для амплификации исследуемых и контрольных образцов.

Внести по 25 мкл

Проб ДНК, экстрагированных из исследуемых образцов	в пробирки для исследуемых образцов, ОК <i>При проведении экстракции методом магнитной сепарации необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь!</i>
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	
K+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG	в пробирку для K+
K-	в пробирку для K-

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.

¹ См. Приложение 1 Инструкции по применению набора реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-FL.

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

- Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени».

ВНИМАНИЕ! Программировать амплификатор допускается автоматически, с помощью ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

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* spp. SFG, 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.

Цикл	Программа амплификации ²				Цикл	Единая программа амплификации «АмплиСенс»			
	Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов		Температура, °C	Время	Детекция флуоресц. сигнала по каналам для флуорофоров	Кол-во циклов
1	95	15 мин	–	1	1	50	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	45	2	95	15 мин	–	1
	60	30 с	FAM, JOE		3	95	10 с	–	45
						60	20 с	FAM, JOE	

Настройки приборов роторного и планшетного типа см. во вкладыше к набору реагентов.

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

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

- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! Анализ и интерпретацию результатов можно проводить в автоматическом режиме, с использованием ПО, зарегистрированного в установленном порядке.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Канал для флуорофора	FAM	JOE
Регистрация сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации	ДНК ВКО STI-87	ДНК <i>Rickettsia</i> spp. SFG

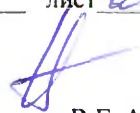
ВНИМАНИЕ! К каждому набору реагентов прилагается **вкладыш**, в котором указаны граничные значения порогового цикла (*Ct*), необходимые для проведения анализа и интерпретации результатов.

² Предпочтительнее использовать программу амплификации, если нет необходимости использовать единую программу амплификации «АмплиСенс».

Верно

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 3
77/4 лист а

Директор ФБУН ЦНИИ
Эпидемиологии
Роспотребнадзора


В.Г. Акимкин

20 19 г.



**ФБУН «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

111123, Москва, ул. Новогиреевская 3А тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

**Набора реагентов
АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-FL**

Форма 1	LOT 23.08.19	 2019-08-23
		 2020-11-23

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Положительный контроль ПЦР (К+) – К+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG	Определены значения Ct не более граничных по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
10-кратное разведение положительного контроля амплификации (К+) – К+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG	Определены значения Ct не более граничных по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
Разведение в 10 раз ВКО STI-87	Определено значение Ct не более граничного по каналу для флуорофора FAM. Отсутствует значение Ct по каналу для флуорофора JOE	соответствует
Отрицательный контроль ПЦР (К-) – К-	Отсутствуют значения Ct по всем каналам детекции	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ПЦР-смесь-FL <i>Rickettsia</i> spp. SFG	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-смесь <i>Rickettsia</i> spp. SFG-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
К+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
К-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2

3. Условия транспортирования и хранения:

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.

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

Хранение.

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

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *Rickettsia* spp. SFG-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи



Руководитель ПК

(Козлова Е.А.)
(Ф.И.О.)

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

КОПИЯ ВЕРНА

Директор

В.А. Акимкин

18.12.2019

**ФБУН «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

111123, Москва, ул. Новогиреевская 3А тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

**Набора реагентов
АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-FL**

Форма 2	LOT A23.08.19	 2019-08-23
		 2020-11-23

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Положительный контроль ПЦР (K+) – K+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG	Определены значения Ct не более граничных по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
10-кратное разведение положительного контроля амплификации (K+) – K+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG	Определены значения Ct не более граничных по каналам для флуорофоров FAM, JOE	соответствует
Разведение в 10 раз ВКО STI-87	Определено значение Ct не более граничного по каналу для флуорофора FAM. Отсутствует значение Ct по каналу для флуорофора JOE	соответствует
Отрицательный контроль ПЦР (K-) – K-	Отсутствуют значения Ct по всем каналам детекции	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации
ПЦР-смесь-FL <i>Rickettsia</i> spp. SFG	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	соответствует	1
ПЦР-смесь <i>Rickettsia</i> spp. SFG-Lyo	Порошок белого цвета	соответствует	2
ПЦР-буфер-Н	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1
K+ <i>Rickettsia</i> spp. SFG	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
K-	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1 2

3. Условия транспортирования и хранения:

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.

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

Хранение.

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

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-L хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь *Rickettsia* spp. SFG-Lyo хранить в пакетах с влагопоглотителем в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

Дата выдачи

23.08.19

Руководитель



(Козлова Е.А.)

(Ф.И.О.)

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
КОПИЯ ВЕРНА

Директор



В.Г. Акимкин

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® *Rickettsia* spp. SFG-FL

Форма 1 **REF** H-3741-1Форма 2 **REF** H-3742-1-4**LOT** 23.08.19**Настройки для приборов роторного типа**

Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q

Канал	Calibrate/Gain Optimisation.../Опт.уровня сигн	Threshold/Порог	Dynamic tube/Динамич.фон	Slope Correct/Коррект. уклона	Eliminate Cycles before/Исключить циклы	More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	5	5 %
JOE/Yellow	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	5	5 %

Примечание – В случае если кривые флуоресценции по каналу FAM/Green и JOE/Yellow не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (NTC threshold /Порог Фона – ПФ) равным 10 %.

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапа циклирования, нажав кнопку **Step Options**, задать скорость нагревания/охлаждения **Ramp Rate 2,5 °C/sec**.

Канал	Threshold/Порог
FAM, HEX	Установить пороговую линию на уровне 5 % от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации

Примечание – Кривая флуоресценции K+ должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

«ДТпрайм»

Метод	Тип анализа	Канал	«Критерий положительного результата ПЦР»	Величина Threshold	Нижняя граница/порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Пороговый (Ct)	Качественный	Fam, Hex/R6G	90 %	10 StD	5 % F(Cp)	30 % F(Cp)	Не использовать	Отключить

Канал	Threshold/Порог
Fam, Hex/R6G	Установить пороговую линию на уровне 3 % от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации

Примечание – Кривая флуоресценции K+ должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Граничные значения порогового цикла Ct

Граничные значения порогового цикла C _t				
Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа	
	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	FAM	JOE
K+	33	30	33	32
OK	33	C _t отсутствует	33	C _t отсутствует
K-	C _t отсутствует		C _t отсутствует	
Исследуемые образцы	32	42	34	43

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
КОПИЯ ВЕРНА

Директор

В.Г. Акимкин

ВКЛАДЫШ
к набору реагентов
АмплиСенс® Rickettsia spp. SFG-FL

Форма 1 **REF** H-3741-1Форма 2 **REF** H-3742-1-4**LOT** A23.08.19**Настройки для приборов роторного типа**

Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q

Канал	Calibrate/Gain Optimisation.../ Опт.уровня сигн	Threshold/ Порог	Dynamic tube/ Динамич.фон	Slope Correct/ Коррект. уклона	Eliminate Cycles before/ Исключить циклы	More Settings/Outlier Removal/Устранение выбросов
FAM/Green	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	5	5 %
JOE/Yellow	от 5FI до 10FI	0,03	включена	включена	5	5 %

Примечание – В случае если кривые флуоресценции по каналу FAM/Green и JOE/Yellow не соответствуют экспоненциальному росту, установить значение порога отрицательных проб (*NTC threshold /Порог Фона – ПФ*) равным 10 %.

Настройки для приборов планшетного типа

CFX96

Примечание – Для каждого шага этапа циклирования, нажав кнопку *Step Options*, задать скорость нагревания/охлаждения *Ramp Rate 2,5 °C/sec*.

Канал	Threshold/Порог
FAM, HEX	Установить пороговую линию на уровне 5 % от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации

Примечание – Кривая флуоресценции K+ должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

«ДТпрайм»

Метод	Тип анализа	Канал	«Критерий положительного результата ПЦР»	Величина Threshold	Нижняя граница/порог положительного результата	Верхняя граница/порог нормализации данных	Нормализация данных	Фитирование (сглаживание) данных
Пороговый (Ct)	Качественный	Fam, Hex/R6G	90 %	10 StD	5 % F(Cp)	30 % F(Cp)	Не использовать	Отключить

Канал	Threshold/Порог
Fam, Hex/R6G	Установить пороговую линию на уровне 3 % от максимального уровня флуоресценции образцов K+ в последнем цикле амплификации

Примечание – Кривая флуоресценции K+ должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, переходящего в линейный подъем.

Граничные значения порогового цикла Ct

Граничные значения порогового цикла Ct				
Образец	Прибор роторного типа		Прибор планшетного типа	
	Канал для флуорофора			
	FAM	JOE	FAM	JOE
K+	33	30	33	32
OK	33	Ct отсутствует	33	Ct отсутствует
K-	Ct отсутствует		Ct отсутствует	
Исследуемые образцы	32	42	34	43

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

КОПИЯ ВЕРНА

Директор

В.Г. Акимкин

18.12.2019г.