

«УТВЕРЖДАЮ»

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

В.Г. Акимкин

«14» февраля 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами,

TBEV, Borrelia burgdorferi sl, Anaplasma phagocytophilum,

Ehrlichia chaffeensis / Ehrlichia muris, в биологическом

материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *TBEV, B.burgdorferi sl,*

***A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris-FL*»**

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ	5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	10
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	12
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..	17
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК.....	19
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	21
СОСТАВ.....	23
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	24
ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	24
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ	25
АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	26
А. Подготовка проб для амплификации	26
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	27
В. Анализ и интерпретация результатов	29
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	33
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	34
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	35

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87-rec	- экзогенный внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
K+	- положительный контроль ПЦР
K-	- отрицательный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
м.к.	- микробные клетки
МУ	- методические указания
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОТ	- обратная транскрипция
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ПКО	- положительный контрольный образец
РНК	- рибонуклеиновая кислота
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
ТЦПД ₅₀	- титр вируса, выраженный в тканевых цитопатических дозах
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
Ct	- cycle threshold (пороговый цикл)
FL	- ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *TBEV*, *B.burgdorferi* *sl*, *A.phagocytophilum*, *E.chaffeensis* / *E.muris*-FL» предназначен для качественного определения РНК *TBEV* – вируса клещевого энцефалита (*Tick-borne encephalitis virus*), *Borrelia burgdorferi* *sl* – возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), *Ehrlichia chaffeensis* и *Ehrlichia muris* – возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), ДНК *Anaplasma phagocytophilum* – возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) в биологическом материале (клещи, цельная венозная кровь, ликвор, тканевой материал) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. Материалом для проведения ПЦР служат пробы РНК/ДНК, экстрагированные из исследуемого материала и прошедшие этап обратной транскрипции (для РНК).

Показания и противопоказания к применению набора реагентов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Набор реагентов используется для профилактики инфекционных заболеваний и в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного из клещей и от лиц с подозрением на наличие клещевых инфекций вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания.

Противопоказания отсутствуют, за исключением случаев, когда взятие материала не может быть осуществлено по медицинским показаниям.

Потенциальные пользователи медицинского изделия

К работе с набором реагентов допускаются только медицинские работники, обученные методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип тестирования основывается на экстракции РНК/ДНК из образцов исследуемого материала совместно с экзогенным внутренним контрольным образцом (ВКО STI-87-rec), проведении реакций обратной транскрипции РНК и амплификации участков ДНК/кДНК выявляемых микроорганизмов и кДНК ВКО STI-87-rec с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. ВКО STI-87-rec позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования.

Обратная транскрипция РНК проводится с помощью фермента ревертазы (MMIv). Затем проводится амплификация участка ДНК/кДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, комплементарные участкам амплифицируемых ДНК/кДНК-мишеней, что позволяет

регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Выявление ДНК/кДНК возбудителей для одного образца проводится в двух пробирках, в одной пробирке дифференцируются 3 возбудителя, в другой – один возбудитель и ВКО STI-87-rec. Результаты амплификации регистрируются по каналам флуоресцентной детекции, указанным в табл. 1:

Таблица 1

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
ПЦР-смесь-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.			
Выявляемая ДНК/кДНК-мишень	кДНК TBEV	ДНК <i>A.phagocytophilum</i>	кДНК <i>E.chaffeensis/E.muris</i>
Область амплификации	С ген	msp2 ген	16S РНК
ПЦР-смесь-1-FRT B.b. sl / ВКО			
Выявляемая ДНК/кДНК-мишень	кДНК ВКО STI-87-rec	кДНК <i>B.burgdorferi sl</i>	—
Область амплификации	искусственная нуклеотидная последовательность	16S РНК	—

ФОРМЫ КОМПЛЕКТАЦИИ

Форма 2: «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F

Примечание – Формы 1 и 3 удалены.

Форма 2 предназначена для проведения амплификации ДНК/кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и позволяет выявлять РНК/ДНК в качественном формате. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК и обратной транскрипции.

Форма 2 рассчитана на проведение 60 тестов (120 реакций амплификации), включая контроли.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения)

Таблица 2

Микроорганизм	Вид исследуемого материала	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Комплект для обратной транскрипции	Аналитическая чувствительность (предел обнаружения), копий/мл
<i>TBEV</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> sl, <i>Ehrlichia chaffeensis</i> и <i>Ehrlichia muris</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Клещи родов <i>Ixodes</i> , <i>Dermacentor</i>	«РИБО-преп»	«РЕВЕРТА-L»	5×10^3
		«МАГНО-сорб»		5×10^3
	Цельная венозная кровь	«РИБО-преп»		5×10^3
	Ликвор	«РИБО-преп»		5×10^3
	Тканевой материал	«РИБО-преп»		5×10^3
		«МАГНО-сорб»		5×10^3

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

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает участки РНК/ДНК заявленных микроорганизмов.

Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании РНК/ДНК штаммов, указанных в табл. 3, а также геномной ДНК человека, ДНК клещей *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus*, ДНК грызунов *Clethrionomys glareolus* и *Apodemus agrarius*.

Таблица 3

Микроорганизм	Штамм	Концентрация
<i>Leptospira kirschneri</i> (серогруппа <i>bataviae</i>)	M20 (Copenhageni)	8×10^7 м.к./мл
<i>Leptospira borgpetersenii</i> (серогруппа <i>Tarassovi</i>)	Poi	8×10^7 м.к./мл
<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	Приморье-25/81	10^6 копий/мл
<i>Rickettsia conorii</i> subsp. <i>conorii</i>	M1	$1,6 \times 10^8$ копий/мл
<i>Borrelia miyamotoi</i>	Izh-4	$1,5 \times 10^8$ копий/мл
<i>Japanese encephalitis virus</i> (JEV)	Pekin-1	Титр 10^6 ТЦПД ₅₀ /мл
<i>West Nile virus</i> (WNV)	Leiv-VLG99-27889 human	3×10^8 копий/мл
<i>Langat virus</i> (LGTV)	TP-21	10^7 копий/мл
<i>Powassan virus</i> (POWV)	Баерс	10^7 копий/мл

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

Информация об интерферирующих веществах 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. Положительные образцы представляли собой смесь стандартных образцов предприятия, содержащих РНК *TBEV*, *Borrelia burgdorferi* sl, *Ehrlichia chaffeensis*, ДНК *Anaplasma phagocytophilum* с концентрацией 5×10^3 копий/мл каждого, в качестве отрицательного образца была использована проба ОК.

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 и разных серий набора реагентов. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Тип образцов	Повторяемость		Воспроизводимость	
	Количество образцов	Совпадение результатов, %	Количество образцов	Совпадение результатов, %
Положительные	10	100	30	100
Отрицательные	10	100	30	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для определения диагностических характеристик набора реагентов были использованы:

- 200 особей клещей из Свердловской, Кемеровской и Курганской областей;
- 500 образцов цельной венозной крови от пациентов, заболевших после присасывания клеща и госпитализированных в стационары Удмуртии и Свердловской области; 100 образцов цельной венозной крови от здоровых доноров, собранных в г. Москва;

50 модельных образцов, приготовленных на основе цельной венозной крови здоровых доноров и стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК *Anaplasma phagocytophilum* и РНК *Ehrlichia chaffeensis* в концентрации 5×10^3 копий/мл (по 25 образцов для каждого возбудителя);

- 25 образцов ликвора от пациентов с менингитами иной этиологии, а также 200 модельных образцов, приготовленных на основе ликвора от пациентов с менингитами иной этиологии и стандартных образцов предприятия, содержащих РНК *TBEV*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Ehrlichia chaffeensis*, ДНК *Anaplasma phagocytophilum* в концентрации 5×10^3 копий/мл (по 50 образцов для каждого возбудителя);
- 25 образцов тканевого материала от пациентов, погибших вследствие заболеваний иной этиологии, а также 200 модельных образцов, приготовленных на основе тканевого материала от пациентов с менингитами иной этиологии и стандартных образцов предприятия, содержащих РНК *TBEV*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Ehrlichia chaffeensis*, ДНК *Anaplasma phagocytophilum* в концентрации 5×10^3 копий/мл (по 50 образцов для каждого возбудителя).

В качестве референтного метода использовались наборы реагентов РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s. l./РНК ВКЭ (РУ № РЗН 2013/1180) и РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum*/*Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis* (РУ № ФСР 2012/13029).

Результаты представлены в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Результаты тестирования набора «АмплиСенс® TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris-FL» в сравнении с референтным методом

Возбудитель	Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris-FL»		Результаты применения референтного метода	
				Положительных	Отрицательных
TBEV	Клещи	Всего исследовано 200 образцов	Положительных	31	0
			Отрицательных	0	169
	Цельная венозная кровь	Всего исследовано 600 образцов	Положительных	42	0
			Отрицательных	0	558
	Ликвор	Всего исследовано 75 образцов	Положительных	50	0
			Отрицательных	0	25
	Тканевой материал	Всего исследовано 75 образцов	Положительных	50	0
			Отрицательных	0	25
<i>Borrelia burgdorferi sl</i>	Клещи	Всего исследовано 200 образцов	Положительных	96	0
			Отрицательных	0	104
	Цельная венозная кровь	Всего исследовано 600 образцов	Положительных	66	0
			Отрицательных	0	534
	Ликвор	Всего исследовано 75 образцов	Положительных	50	0
			Отрицательных	0	25
	Тканевой материал	Всего исследовано 75 образцов	Положительных	50	0
			Отрицательных	0	25
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Клещи	Всего исследовано 200 образцов	Положительных	27	0
			Отрицательных	0	173
	Цельная венозная кровь	Всего исследовано 625 образцов	Положительных	25	0
			Отрицательных	0	600
	Ликвор	Всего исследовано 75 образцов	Положительных	50	0
			Отрицательных	0	25
	Тканевой материал	Всего исследовано 75 образцов	Положительных	50	0
			Отрицательных	0	25

Возбудитель	Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris-FL»		Результаты применения референтного метода	
				Положительных	Отрицательных
<i>Ehrlichia chaffeensis</i> / <i>Ehrlichia muris</i>	Клещи	Всего исследовано 200 образцов	Положительных	25	0
			Отрицательных	0	175
	Цельная венозная кровь	Всего исследовано 625 образцов	Положительных	25	0
			Отрицательных	0	600
	Ликвор	Всего исследовано 75 образцов	Положительных	50	0
			Отрицательных	0	25
	Тканевой материал	Всего исследовано 75 образцов	Положительных	50	0
			Отрицательных	0	25

Таблица 6

**Диагностические характеристики набора реагентов
«АмплиСенс® TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum,
E.chaffeensis / E.muris-FL»**

Возбудитель	Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
<i>TBEV</i>	Клещи	100 (88,78 – 100) %	100 (97,84 - 100) %
	Цельная венозная кровь	100 (91,59 – 100) %	100 (99,34 - 100) %
	Ликвор	100 (92,89 – 100) %	100 (86,28 - 100) %
	Тканевой материал	100 (92,89 – 100) %	100 (86,28 - 100) %
<i>Borrelia burgdorferi sl</i>	Клещи	100 (96,23 – 100) %	100 (96,52 – 100) %
	Цельная венозная кровь	100 (94,56 – 100) %	100 (99,31 – 100) %
	Ликвор	100 (92,89 – 100) %	100 (86,28 - 100) %
	Тканевой материал	100 (92,89 – 100) %	100 (86,28 - 100) %

¹ Относительная чувствительность в сравнении с использованным референтным методом.

² Относительная специфичность в сравнении с использованным референтным методом.

Возбудитель	Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ¹ (с доверительной вероятностью 95 %)	Диагностическая специфичность ² (с доверительной вероятностью 95 %)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Клещи	100 (87,23 – 100) %	100 (97,89 - 100) %
	Цельная венозная кровь	100 (86,28 – 100) %	100 (99,39 - 100) %
	Ликвор	100 (92,89 – 100) %	100 (86,28 - 100) %
	Тканевой материал	100 (92,89 – 100) %	100 (86,28 - 100) %
<i>Ehrlichia chaffeensis</i> / <i>Ehrlichia muris</i>	Клещи	100 (86,28 – 100) %	100 (97,91 - 100) %
	Цельная венозная кровь	100 (86,28 – 100) %	100 (99,39 - 100) %
	Ликвор	100 (92,89 – 100) %	100 (86,28 - 100) %
	Тканевой материал	100 (92,89 – 100) %	100 (86,28 - 100) %

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Формы комплектации»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75 %.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке.
- 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 использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор реагентов безопасен.

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы,

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

загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Вакуумная система забора крови типа Vacuette (например, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия).
2. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 2,0 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
3. Иглы пункционные (например, Gebruder Martin GmbH & Co. KG («Гебрюдер Мартин ГмбХ & Ко. КГ»), Германия).
4. Контейнер пластиковый для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов объемом 50-60 мл, стерильный (например, ООО «Комбитек Пластик», Россия).
5. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) для взятия смывов с первичного аффекта.

Предварительная подготовка исследуемого материала

6. 0,9 % раствор натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; pH=7,5±0,2) для проведения пробоподготовки тканевого материала и клещей.
7. 96 % раствор этанола для проведения пробоподготовки

- клещей, обработанных маслом.
8. Глицерин для хранения обработанных клещей.
 9. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 10. Заворачивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США).
 11. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 12. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 13. Отдельные для каждой пробы стерильные инструменты для гомогенизации (фарфоровая ступка с пестиком) или гомогенизатор для проведения пробоподготовки тканевого материала и клещей.
 14. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия).
 15. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
 16. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», АО «Ульяновское конструкторское бюро приборостроения», Россия).
 17. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия; АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия; Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).
 18. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
 19. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
 20. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов

21. Комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК (в зависимости от типа исследуемого материала, см. раздел инструкции

«Проведение ПЦР-исследования», подраздел «Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов») – «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147) или «МАГНО-сорб» (ПУ № ФСР 2010/07265).

22. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК.

При использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот:

23. Автоматическая станция для экстракции НК (например, KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific Oy («Термо Фишер Сайентифик Ой»), Финляндия (ПУ № ФСЗ 2009/05562)), Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. (ООО «Ханчжоуская компания инструментов Аошэн»), Китай (ПУ № РЗН 2022/16430))).

24. Набор реагентов для экстракции РНК/ДНК на автоматической станции «открытого типа» (например, «МАГНО-сорб» (ПУ № ФСР 2010/07265)).

25. Набор необходимых расходных материалов к используемой автоматической станции.

Обратная транскрипция

26. Комплект реагентов для обратной транскрипции РНК – «РЕВЕРТА-L» (ПУ № ФСР 2008/03994).

27. Дополнительные материалы и оборудование для обратной транскрипции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов.

Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации

28. Одноразовые полипропиленовые пробирки:

- а) завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) 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) – при использовании прибора планшетного типа;
- в) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с

- плоской крышкой (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США) или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия) – при использовании прибора роторного типа.
29. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 30. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
 31. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
 32. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
 33. Автоматические дозаторы переменного объема (например, Sartorius Biohit Liquid Handling Oy («Сарториус Биохит Ликвид Хэндлинг Ой»), Финляндия; АО «Термо Фишер Сайентифик», Россия; Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).
 34. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия (РУ № ФСЗ 2010/07595)), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США (РУ № ФСЗ 2008/03399)), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия (РУ № ФСР 2011/10229))).
 35. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
 36. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
 37. Емкость для сброса наконечников.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат:

- цельная венозная кровь,
- тканевой материал,
- клещи,
- ликвор.

Цельная венозная 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 антикоагулянтом. (В противном случае кровь свернется и экстракция РНК/ДНК станет невозможной!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

Допускается хранение образцов крови до получения и подготовки лейкоцитов к экстракции РНК/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 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 до проведения предварительной подготовки:

- 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.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Ликвор (спинномозговая жидкость)

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

Допускается хранение образцов ликвора до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Клещи

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

Допускается хранение материала после разбора и формирования проб:

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

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/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 РНК/ДНК проводить из осадка клеток и 200 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 материала требуют предварительной подготовки.

Для экстракции РНК/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. 50 мкл полученной суспензии используют для экстракции РНК/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.

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. Отобразить надосадочную жидкость в контейнер для утилизации отходов. В экстракцию РНК/ДНК берут осадок клеток, находящийся в 200 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.

Клещи требуют предварительной подготовки.

При исследовании пулов клещей число особей в одном пуле не должно превышать 10. Особей клещей рода *Dermacentor* предпочтительнее исследовать индивидуально. Клещей поместить в пробирки объемом 1,5 мл, куда внести **500 мкл** 96 % раствора 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 **300 мкл** (если проба состоит из одного клеща рода *Ixodes*), **500 мкл** (при исследовании клеща рода *Dermacentor*) или **1 мл** (если гомогенизируют пул клещей) 0,9 % раствора натрия хлорида (стерильный физиологический раствор) или фосфатного буферного раствора (PBS), гомогенизировать пробу.

ВНИМАНИЕ! При ручной гомогенизации клещей с высокой степенью наитанности рекомендуется перед гомогенизацией проколоть его одноразовой иглой для выхода крови и предупреждения разбрызгивания материала при растирании в ступке.

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 РНК/ДНК из клещей рода *Ixodes* отобрать **100 мкл** надосадочной жидкости, для экстракции РНК/ДНК из клещей рода *Dermacentor* – **50 мкл**. 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 РНК/ДНК и реакции амплификации в наборе реагентов предусмотрено использование внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-rec), который добавляется в каждый биологический образец на этапе экстракции нуклеиновых кислот. По окончании реакции амплификации наличие сигнала, свидетельствующего о накоплении фрагментов кДНК ВКО STI-87-rec, говорит о достаточной эффективности экстракции нуклеиновых кислот и отсутствии ингибиторов ПЦР.

Ограничения по использованию проб

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

Потенциально интерферирующие вещества

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

Были протестированы модельные образцы цельной

венозной крови без добавления и с добавлением потенциально интерферирующих веществ. Концентрация каждого потенциально интерферирующего вещества указана в табл. 7. В модельные образцы добавляли также стандартные образцы предприятия, содержащие РНК *TBEV*, *Borrelia burgdorferi* sl, *Ehrlichia chaffeensis* и *Ehrlichia muris*, ДНК *Anaplasma phagocytophilum* с концентрацией каждой из мишеней, равной 5×10^4 копий/мл.

Таблица 7

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	7,8 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 ⁴	Литий гепарин	от 12 до 30 МЕ/мл	<u>Обнаружено</u>
	Калий ЭДТА	от 1,2 до 2,0 мг/мл	Не обнаружено

⁴ 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.

СОСТАВ

«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участков ДНК/кДНК *TBEV*, *B.burgdorferi* *sl*, *A.phagocytophilum*, *E.chaffeensis* / *E.muris* с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1-FRT <i>TBEV</i> , <i>A.ph.</i> , <i>E.ch.</i> / <i>E.m.</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT <i>B.b. sl</i> / ВКО	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	1 пробирка
ПЦР-буфер-С	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ПКО кДНК <i>TBEV</i> , <i>B.b. sl</i> , <i>A.ph.</i> , <i>E.ch.</i> / <i>E.m.</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
К–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

Реагенты комплекта упакованы отдельно в соответствии с температурой хранения (см. раздел «Хранение»). Комплект реагентов состоит из 2-х частей: 1) температура хранения от 2 до 8 °С; 2) температура хранения от минус 24 до минус 16 °С.

Эксплуатационная документация в составе: инструкция по применению, паспорт качества набора реагентов, вкладыш к набору реагентов, краткое руководство к набору реагентов – на бумажном носителе и на сайте Изготовителя (www.amplisens.ru).

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов,
- обратная транскрипция РНК,
- амплификация ДНК/кДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»,
- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

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

- «РИБО-преп» – для экстракции РНК/ДНК из клеток, цельной венозной крови, ликвора, тканевого материала в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов,
- «МАГНО-сорб» – для экстракции РНК/ДНК из клеток и тканевого материала в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

Комплект реагентов «МАГНО-сорб» может применяться совместно с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот «открытого типа»⁵. Экстракция нуклеиновых кислот проводится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов «МАГНО-сорб».

Экстракцию РНК/ДНК из каждого исследуемого образца и контролей необходимо проводить в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-STI-87-rec**.

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

Экстракция РНК/ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-STI-87-rec**.

Объем ВКО-STI-87-rec – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца: при исследовании крови и

⁵ Станции, совместимые с наборами реагентов различных изготовителей.

ликвора – осадок и **200 мкл** надосадочной жидкости, при исследовании тканевого материала – **50 мкл** суспензии, при исследовании клещей – **100 мкл** суспензии клещей рода *Ixodes* и **50 мкл** суспензии клещей рода *Dermacentor*.

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

Объем элюции: **50 мкл** – при экстракции из суспензии тканевого материала и суспензии клещей, **100 мкл** – при экстракции из осадка клеток ликвора и лейкоцитарного осадка крови.

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

Экстракция РНК/ДНК из каждого исследуемого образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-STI-87-rec**.

Объем ВКО-STI-87-rec – **10 мкл** в каждую пробирку.

Объем исследуемого образца: при исследовании тканевого материала – **50 мкл** суспензии, при исследовании клещей – **100 мкл** суспензии клещей.

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

Объем элюции: **100 мкл**.

ВНИМАНИЕ! Реакцию ОТ рекомендуется проводить сразу после получения проб РНК/ДНК. Допускается хранение проб РНК/ДНК при температуре от 2 до 8 °С не более 30 мин, при температуре от минус 24 до минус 16 °С не более недели и при температуре не выше минус 68 °С до года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание проб РНК/ДНК.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Для получения кДНК на матрице РНК используется комплект реагентов «РЕВЕРТА-L». Порядок работы с комплектом реагентов «РЕВЕРТА-L» смотрите в инструкции к комплекту реагентов для получения кДНК на матрице РНК.

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/кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

А. Подготовка проб для амплификации

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

ВНИМАНИЕ! Полученная ДНК/кДНК каждой пробы исследуется в двух пробирках: с ПЦР-смесью-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* и с ПЦР-смесью-1-FRT *B.b. sl / ВКО*.

1. Рассчитать количество каждого реагента, требующееся для приготовления двух реакционных смесей. На одну реакцию требуется 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* или ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО*, 5 мкл ПЦР-буфера-С и 0,5 мкл полимеразы (TaqF). Смеси готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов (количество контрольных образцов см. в п.7) плюс запас на несколько реакций.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР-исследования.

2. Разморозить пробирки с ПЦР-смесью-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* и ПЦР-смесью-1-FRT *B.b. sl / ВКО*. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-буфером-С и полимеразой (TaqF), осадить капли на вортексе.
3. В двух отдельных пробирках приготовить две реакционные смеси. В одной пробирке смешать необходимое количество ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*, полимеразы (TaqF), ПЦР-буфера-С, в другой – ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО*, полимеразы (TaqF) и ПЦР-буфера-С. Тщательно перемешать, осадить капли на вортексе.

4. Отобрать необходимое (двукратное) количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК/кДНК исследуемых и контрольных проб.
5. Внести в каждую пробирку первого ряда по **15 мкл** одной из приготовленных реакционных смесей, в каждую пробирку второго ряда по **15 мкл** другой реакционной смеси. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
6. В две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл проб ДНК/кДНК**, полученных в результате экстракции и обратной транскрипции из исследуемых образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл ПКО кДНК TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m. / STI**.
 - б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл К–**.
 - в) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в две пробирки с различными реакционными смесями внести по **10 мкл** пробы отрицательного контроля, полученного в результате экстракции и обратной транскрипции.

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

ВНИМАНИЕ! Провести ПЦР сразу после соединения реакционной смеси с ДНК/кДНК-пробами и контролями.

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. 8).

Таблица 8

Программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала для приборов роторного⁶ и планшетного⁷ типа

Цикл	Приборы роторного типа			Приборы планшетного типа		
	Температура, °C	Время	Кол-во циклов	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	5	95	10 с	5
	60	30 с		60	35 с	
	72	15 с		72	15 с	
3	95	10 с	40	95	10 с	40
	56	30 с детекция флуоресц. сигнала		56	35 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с		72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров **FAM, JOE, ROX**.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Первыми в ячейки прибора роторного типа ставятся пробирки с **ПЦР-смесью-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.** 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.

⁶ Например, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research), Rotor-Gene Q (QIAGEN).

⁷ Например, «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология»), CFX96 (Bio-Rad).

В. Анализ и интерпретация результатов

ВНИМАНИЕ! Установление диагноза и назначение лечения должны производиться врачом соответствующей специализации.

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации в соответствии с табл. 9:

Таблица 9

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX
ПЦР-смесь-1-FRT <i>TBEV</i>, <i>A.ph.</i>, <i>E.ch.</i> / <i>E.m.</i>			
Выявляемая ДНК/кДНК-мишень	кДНК <i>TBEV</i>	ДНК <i>A.phagocytophilum</i>	кДНК <i>E.chaffeensis</i> / <i>E.muris</i>
ПЦР-смесь-1-FRT <i>B.b. sl</i> / ВКО			
Выявляемая ДНК/кДНК-мишень	кДНК ВКО STI-87-rec	кДНК <i>B.burgdorferi sl</i>	—

Анализ и интерпретацию полученных результатов проводят с помощью ПО прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени».

Для анализа и интерпретации результатов используют значения порогового цикла (*C_t*), полученные на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Принцип интерпретации результатов указан в таблице 10:

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)			Результат
FAM	JOE	ROX	
ПЦР-смесь-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.			
<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	кДНК TBEV обнаружена
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	определено или отсутствует	ДНК A.phagocytophilum обнаружена
определено или отсутствует	определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	кДНК E.chaffeensis/E.muris обнаружена
отсутствует или больше граничного	определено или отсутствует	определено или отсутствует	кДНК TBEV НЕ обнаружена*
определено или отсутствует	отсутствует или больше граничного	определено или отсутствует	ДНК A.phagocytophilum НЕ обнаружена*
определено или отсутствует	определено или отсутствует	отсутствует или больше граничного	кДНК E.chaffeensis/E.muris НЕ обнаружена*
ПЦР-смесь-1-FRT B.b. sl / ВКО			
определено или отсутствует	<u>определено</u> меньше граничного	—	кДНК B.burgdorferi sl обнаружена
<u>определено</u> меньше граничного	отсутствует или больше граничного	—	кДНК B.burgdorferi sl НЕ обнаружена
отсутствует или больше граничного	отсутствует или больше граничного	—	Невалидный**

* Если для данного исследуемого образца значение Ct меньше граничного по каналу для флуорофора FAM с ПЦР-смесью-1-FRT B.b. sl / BKO.

** Если для данного исследуемого образца значение Ct отсутствует или больше граничного по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX с ПЦР-смесью-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.

При получении невалидного результата необходимо провести повторное ПЦР-исследование соответствующего исследуемого образца.

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/кДНК в соответствии с табл. 11 и вкладышем, прилагаемым к набору реагентов.

Таблица 11

Результаты для контролей различных этапов

Конт- роль	Контроли- руемый этап ПЦР-исследо- вания	Значение порогового цикла по каналу для флуорофора (Ct)		
		FAM	JOE	ROX
ПЦР-смесь-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.				
OK	Экстракция РНК/ДНК	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K-	ПЦР	отсутствует	отсутствует	отсутствует
K+	ПЦР	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного	<u>определено</u> меньше граничного
ПЦР-смесь-1-FRT B.b. sl / ВКО				
OK	Экстракция РНК/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 (Ct) по какому-либо каналу (или каналам) для флуорофоров FAM, JOE, ROX при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.** и по каналам для флуорофоров FAM и JOE при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT B.b. sl / ВКО** отсутствует или превышает граничное значение. Необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК или ДНК, детектируемая по данному каналу (или каналам).
2. Для отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК (OK) (по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.** и по каналу для флуорофора JOE при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT B.b. sl / ВКО**) и/или отрицательного контроля ПЦР (K–) (по всем каналам) 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 ДНК или кДНК, детектируемая по данному каналу (или каналам).

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.

Хранение.

Форма 2. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F хранить в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С, кроме ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*, ПЦР-смеси-1-FRT *B.burgdorferi sl* / ВКО, ПЦР-буфера-С и полимеразы (TaqF). ПЦР-смесь-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*, ПЦР-смесь-1-FRT *B.burgdorferi sl* / ВКО, ПЦР-буфер-С и полимеразу (TaqF) хранить в морозильной камере при температуре от минус 24 до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.* и ПЦР-смесь-1-FRT *B.b. sl* / ВКО хранить в защищенном от света месте.

Холодильные и морозильные камеры должны обеспечивать регламентированный температурный режим.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

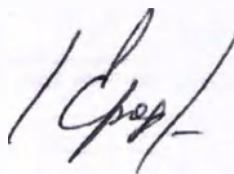
Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

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: obtk@pcr.ru. Отзывы и предложения о продукции АмплиСенс® вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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 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.

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского



К.Э. Соболев

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!



Код партии



Содержимого достаточно для проведения n тестов



Медицинское изделие для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к инструкции по применению



Предел температуры



Не допускать воздействия солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

КОПИЯ ВЕРНА

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 35
(приложение пять) лист 06

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 169/22 от 16.11.2022 г.)



«25» 06
2023 г.

А.О.Лисицына