УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения Республики Беларусь

_____ И.В. Росицкий
«___» _____ 2015 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

_____ В.А. Горбунов
«16» 11 2015 г.

ТЕСТ-СИСТЕМА
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»
«Белар-КИ-ПЦР/РВ»
инструкция по применению

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора
УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»

_____ С.И. Зинченко
«16» 11 2015 г.

СОГЛАСОВАНО
Ректор ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

_____ М.А. Герасименко
_____ 2015 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач УЗ «Городская инфекционная клиническая больница»

_____ Н.Н. Юровский
«___» _____ 201_ г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»
Письмо № 10-03/68
_____ В.В. Гринь
«13» 11 2015 г.

ВЕРНО
Зав. канц. Мохоткина Т.Л.
22.10.2020

Минск, 2015 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Тест-система «Белар-КИ-ПЦР/РВ» представляет собой набор реагентов для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» с целью выявления ДНК *Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris* и РНК вируса клещевого энцефалита в клинических образцах пациентов (плазма крови) с подозрением на клещевые инфекции (КИ), а также полевом материале (клещах).

Основным свойством диагностической тест-системы является ее способность выявлять ДНК *B. burgdorferi, A. phagocytophilum*, *E. muris* и РНК вируса клещевого энцефалита в клинических образцах пациентов с подозрением на КИ (плазма крови), а также полевом материале (клещах).

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу ROX для регистрации накопления продуктов амплификации фрагментов ДНК *A. phagocytophilum* и вируса клещевого энцефалита, по каналу FAM для регистрации продукта амплификации ДНК *B. burgdorferi, E. muris* и ДНК ВКО.

Постановку реакции следует производить, как это принято при работе с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, маске, сменном халате. Все использованные материалы необходимо подвергать обработке дезинфицирующими средствами в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.14-20-2005.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система предназначена для выявления ДНК *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum, E. muris* и РНК вируса клещевого энцефалита в клинических образцах пациентов с подозрением на КИ (плазма крови), а также полевом материале (клещах) по технологии TaqMan (с использованием гибридизационно–флуоресцентных проб).

Тест-система рассчитана на проведение 60 исследований, включая контроли.

2. СОСТАВ НАБОРА

2.1	ПЦР-смесь-1/*B.b. sl./A.ph.*	5 эп. (240 мкл)
2.2	ПЦР-смесь-2/*Flavi*/ВКО	5 эп. (240 мкл)
2.3	ПЦР-смесь-3/*E.m.*	5 эп. (240 мкл)
2.4	TrueStart™ Taq ДНК полимераза (5ед/мкл)	1 эп. (100 мкл)
2.5	ПКО/ *B.b. sl.*, ПКО/ *A.ph.*, ПКО/*E.m.*, ПКО/*Flavi*	4 эп. (50 мкл)
2.6	Положительная контрольная проба $К^{+Flavi}$ ОТ-ПЦР	5 эп. (100 мкл)
2.7	ВКО	5 эп. (120 мкл)
2.8	ОКО	1 эп. (500 мкл)
2.9	К- ПЦР	1 эп. (500 мкл)

Набор реагентов рассчитан для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» с целью выявления ДНК/РНК возбудителей КИ.

Внимание: Тест-система **не укомплектована** наборами реагентов для выделения ДНК/РНК и постановки реакции обратной транскрипции (ОТ).

Для экстракции ДНК/РНК из плазмы крови и суспензий клещей рекомендуется использовать набор реагентов «РИБО-преп» производства «АмплиСенс», РФ; либо аналогичный.

Для постановки ОТ (при исследовании пробы на флавивирусы) рекомендуется использовать коммерческий набор реагентов «Reverta-L», производства АмплиСенс, РФ в соответствии с прилагаемой инструкцией.

ВЕРНО
Зав. канц. Махотина Т.Н.

Минздрав РФ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Меры предосторожности

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования (ПЦР) клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением «Правил противоэпидемического режима при работе с микроорганизмами 2 группы патогенности».

Работа проводится только в одноразовых перчатках, используются одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) обеззараживается 3-5%-ным раствором перекиси водорода в специальных контейнерах, после чего разрешается слив в общую канализационную сеть.

Постановку ПЦР осуществляют в 3 рабочих зонах. Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – выделение РНК из проб биологического материала. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, постановка реакции обратной транскрипции, внесение проб в микропробирки с ПЦР-реагентами, постановка ПЦР. Зона 3 – проведение амплификации. Пробы из Зоны 3 запрещается переносить в Зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей.

При утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР после амплификации, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

Пипетки или наконечники должны иметь аэрозольный барьер. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую. Поверхности столов, а также помещения, где проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом.

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать набор по истечению срока годности.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

4.1 Набор реагентов «РИБО-преп» производства «АмплиСенс», РФ, либо аналогичный – для экстракции ДНК/РНК из плазмы крови и клещевой суспензии.

4.2 Набор реагентов «Reverta L», производства АмплиСенс, РФ - для постановки реакции ОТ (при исследовании пробы на наличие РНК вируса клещевого энцефалита).

4.3 Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», например IQ 5 Bio-Rad, США; Rotor-Gene 3000/6000 Corbett Research, Австралия.

4.4 Настольный бокс с бактерицидной лампой (например, «Biocom» или любой другой марки) либо стерильный ламинарный шкаф (например, Kojair KR-125 Safety или любой другой марки).

4.5 Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25 – 100 0С (например, «Biocom» или любой другой марки).

4.6 Термоциклер (например, Терцик производства «ДНК-технология», Россия; CG1-96 производства «Corbett Reserch», Австралия, либо аналогичный).

4.7 Центрифуга-вортекс (любой марки).

4.8 Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин. (любой марки).

4.9 Вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой (любой марки).

4.10 Набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», «Gilson» либо любой другой марки).

4.11 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

ВЕРНО
Зав. канц. Мохоткина Т.П.
22.10.2020

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4.12 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл.

4.13 Пробирки RNAase- и DNAase-free типа «Эппендорф» на 1,5 мл, на 0,5 мл или на 0,2 мл (в соответствии с требованиями к используемому амплификатору с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»).

4.14 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

4.15 Холодильник на 2 – 8 °С и на минус 20 °С, морозильник на минус 20°С.

4.16 Ёмкость для сброса наконечников.

5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

5.1 Подготовка материала для исследования.

5.1.1 Получение плазмы крови.

Для получения плазмы забор крови производят натощак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл. Кровь из шприца аккуратно, без образования пены, переносят в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом (6% раствор ЭДТА в соотношении 1:20 или 3,8% раствор цитрата Na в соотношении 1:9). Гепарин в качестве коагулянта использовать нельзя (ингибирует ПЦР)! Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом). Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800 – 1600g (3000 об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в объеме не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

5.1.2 Подготовка клещевой суспензии.

Первоначально проводят отмывку клещей:

- клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл куда вносят 1 мл 96% этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 3-5 с при 2000 g (5000 об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с крышки пробирки;
- с помощью вакуумного аспираторaa отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют спирт из пробирки;
- вносят в пробирку 1 мл 0,15 М раствора хлорида натрия (физиологический раствор), встряхивают пробирку и осаждают капли с крышки пробирки, как описано выше;
- с помощью вакуумного аспиратора удаляют раствор хлорида натрия из пробирки;

- для приготовления суспензии клещей используют стерильные фарфоровые чашки и пестики. Клещей переносят в фарфоровую чашку, растирают в 200-300 мкл (если проба состоит из одного клеща) хлорида натрия и 0,7-1,0 мл раствора для пула из 7-10 клещей;
- полученную суспензию клещей переносят отдельными накочечниками с фильтром в микроцентрифужные пробирки и центрифугируют при 5000 об/мин в течение 2-3 мин для осветления пробы;

Для выделения ДНК/РНК отбирают 100 мкл надосадочной жидкости.

5.2. Выделение ДНК/РНК проводится в Зоне 1 с использованием набора реагентов «РИБО-преп» производства «АмплиСенс», РФ; согласно прилагаемой инструкции.

ВНИМАНИЕ: тест-система укомплектована внутренним контрольным образцом (ВКО), который вносится в количестве 10 мкл в каждый исследуемый образец, включая ОКО и $К^{+Flavi}$ ОТ-ПЦР, до начала процедуры выделения ДНК/РНК для контроля этапа выделения генетического материала. Для контроля стадии выделения одновременно с исследуемыми образцами проводится выделение ДНК/РНК из 100 мкл контрольных образцов (ОКО, $К^{+Flavi}$ ОТ-ПЦР).

5.3 Постановка реакции обратной транскрипции (ОТ) для выявления РНК флавивирусов, вызывающих арбовирусные инфекции человека – проводится в Зоне 2 –

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР
ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

ВЕРНО
Зав. канц. Мохотина Т.Л.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

осуществляется с использованием коммерческого набора реагентов «Reverta L», производства АмплиСенс, РФ, в соответствии с прилагаемой инструкцией. Полученная в результате кДНК используется в дальнейшем для постановки ПЦР.

5.4. Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов реакции в режиме «реального времени» – проводится в Зонах 2 и 3.

Выбор микропробирок (плашек) для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК/РНК, проб комплементарной ДНК (кДНК), полученной в результате постановки ОТ (п.5.3) и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ: полученная в результате выделения ДНК каждой анализируемой пробы исследуется в двух пробирках с ПЦР-смесью-1/*B.b. sl./A.ph,* ПЦР-смесью-3/*E.m.;* пробы кДНК, полученные в результате постановки ОТ анализируются с ПЦР-смесью-2/Flavi/ВКО.

5.4.1 Разморозить, тщательно перемешать на вортексе ПЦР-смесь-1/*B.b. sl./A.ph.*, ПЦР-смесь-3/*E.m.*, ПЦР-смесь-2/*Flavi*/ВКО, ПКО/*B.b. sl.*, ПКО/*A.ph.*, ПКО/*E.m.*, ПКО/*Flavi*, К- ПЦР и осадить капли с крышек пробирок.

5.4.2 Фермент Taq ДНК полимеразу достать из морозильника, перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки и поместить на хладоэлемент либо на ледяную баню.

Смешать в чистых отдельных пробирках реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, согласно таблице:

Количество реакций*	Объем ПЦР-смеси, мкл (ПЦР-смесь-1/ *B.b. sl./A.ph.*, либо ПЦР-смесь-2/ Flavi/ВКО, либо ПЦР-смесь-3/ E.m.)	Объем Taq ДНК полимеразы, мкл
1	19,5	0,5
5	97,5	2,5
8	156	4
12	234	6
24	468	12

* - следует учитывать, что при проведении исследования для каждой ПЦР-смеси должны быть поставлены в обязательном порядке соответствующие контроли:

ПЦР-смесь-1/ *B.b. sl./A.ph.*	**ПЦР-смесь-2/ *Flavi*/ВКО**	**ПЦР-смесь-3/ *E.m.***
- ПКО/*B.b. sl.*	- $К^{+Flavi}$ ОТ-ПЦР (кДНК, п.5.3)	- ПКО/*E.m.*
- ПКО/*A.ph.*	- ПКО/*Flavi*	- $К^{-}$ ПЦР
- $К^{-}$ ПЦР	- $К^{-}$ ПЦР	- ОКО (ДНК, п.5.2)
- ОКО (ДНК, п.5.2)	- ОКО (кДНК, п.5.3)	

Общий объем реакционной смеси составляет 25 мкл, включая объем пробы ДНК либо кДНК – 5 мкл.

5.4.3 Внести приготовленные смеси в микропробирки по 20 мкл. Используя наконечник с фильтром, добавить по 5 мкл ДНК/РНК (для ПЦР-смеси-1/ *B.b. sl./A.ph* и ПЦР-смеси-3/ *E.m.*), по 5 мкл кДНК (для ПЦР-смеси-2/ Flavi/ВКО) исследуемых проб и по 5 мкл необходимых контролей в пробирки с каждой реакционной смесью. Для удаления пузырьков и осаждения капель со стенок пробирок осуществить их кратковременное центрифугирование на микроцентрифуге-вортексе в течение нескольких секунд.

Минздрав РФ
Государственное учреждение
ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

ВЕРНО
Начальник отдела Т.Л.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru / info@nevacert.ru

5.4.4 Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции продуктов реакции в режиме «реального» времени) для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (находится в Зоне 3):

Цикл	Температура °С	Время	Количество циклов
1	95	3 мин	1
2	94	15 с	40
	60	30 с	
	72	45 с Детекция флуоресцентного сигнала по каналам FAM/ROX	

5.4.5 Установить микропробирки в ячейки реакционного модуля прибора и запустить выполнение программы.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналам FAM и ROX в следующем соответствии:

ПЦР-смесь/Канал	FAM	ROX
ПЦР-смесь-1/*B.b. sl./A.ph.*	*B. burgdorferi*	*A. phagocytophilum*
ПЦР-смесь-2/*Flavi*/ВКО	ВКО	вирус клещевого энцефалита
ПЦР-смесь-3/*E.m.*	*E. muris*	-

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или, соответственно, отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла «Ct».

Результат амплификации по каналу считается положительным, если кривая однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, отрицательным в случае отсутствия пересечения кривой с пороговой линией (нет значения «Ct»), сомнительным во всех других случаях.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Образец учитывается как положительный на наличие ДНК *B. burgdorferi*, если при использовании ПЦР-смеси-1/*B.b. sl./A.ph.* для этого образца значение «Ct» по каналу FAM меньше либо равно 35.

Образец учитывается как положительный на наличие ДНК *A. phagocytophilum*, если при использовании ПЦР-смеси-1/*B.b. sl./A.ph.* для этого образца значение «Ct» по каналу ROX меньше либо равно 35.

Образец учитывается как положительный на наличие РНК вируса клещевого энцефалита, если при использовании ПЦР-смеси-2/Flavi/ВКО для этого образца значение «Ct» по каналу ROX меньше либо равно 35, а по каналу FAM меньше либо равно 35 (для ВКО).

ВЕРНО
Зав. канц. Мажотина Т.Л.

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Образец учитывается как положительный на наличие ДНК *E. muris*, если при использовании ПЦР-смеси-3/*E.m.* для этого образца значение «Ct» по каналу FAM меньше либо равно 35.

Таким образом, значение порогового цикла «Ct» **не должно превышать граничное значение – 35 цикл амплификации.**

Образец учитывается как отрицательный на наличие ДНК *B. burgdorferi*, если при использовании ПЦР-смеси-1/*B.b. sl./A.ph.* для этого образца значение «Ct» по каналу FAM не определяется либо больше 35.

Образец учитывается как отрицательный на наличие ДНК *A. phagocytophilum*, если при использовании ПЦР-смеси-1/*B.b. sl./A.ph.* для этого образца значение «Ct» по каналу ROX не определяется либо больше 35.

Образец учитывается как отрицательный на наличие РНК вируса клещевого энцефалита, если при использовании ПЦР-смеси-2/Flavi/ВКО для этого образца значение «Ct» по каналу ROX не определяется либо больше 35, а по каналу FAM меньше либо равно 35.

Образец учитывается как отрицательный на наличие ДНК *E. muris*, если при использовании ПЦР-смеси-3/*E.m.* для этого образца значение «Ct» по каналу FAM не определяется либо больше 35.

Образец считается сомнительным в случае получения сомнительного результата по любому из каналов. Рекомендуется повторное ПЦР-исследование соответствующего образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных (ПКО/*B.b.sl.*, ПКО/*A.ph.*, ПКО/*E.m.*, ПКО/*Flavi*) и отрицательного ($К^-$ПЦР) контролей амплификации, положительного ($К^{+Flavi}$ ОТ-ПЦР) и отрицательного (ОКО) контролей экстракции ДНК/РНК.

6. ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система «Белар-КИ-ПЦР/РВ» выпускается в виде упакованного набора. Тест-система рассчитана на проведение 60 исследований включая контроли.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Тест-систему хранят при (-20±2) °С. Транспортирование тест-системы должно производиться при температуре (+2,0±2)^{0}С в течение суток.

Срок годности тест-системы – 6 месяцев с даты изготовления.

Разработчики

Руководитель лаборатории _____ А.Г. Красько

Ведущий научный сотрудник _____ Е.П. Счеслёнок

Ведущий научный сотрудник _____ П.А. Семижон

Ведущий научный сотрудник _____ С.А. Дракина

Научный сотрудник _____ О.Р. Князева

ВЕРНО
Зав. канц. Махотина Т.Л.

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР
ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru / info@nevacert.ru