«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

_____ М.Д. Хусаинов

«28» _____06_____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК боррелий комплекса Borrelia burgdorferi sensu lato методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК Borrelia burgdorferi s. l.»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК боррелий комплекса Borrelia burgdorferi sensu lato методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК Borrelia burgdorferi s. l.» предназначен для выявления ДНК патогенных для человека видов боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из биологических проб проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000». Набор реагентов «РеалБест ДНК Borrelia burgdorferi s. l» может быть применён для анализа клинического материала, а также клещей.

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного

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

участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров ДНК-полимеразой.

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

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

– положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка (1 мл);

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок (6 стрипов по 8 пробирок);

– раствор для подготовки образцов (РПО) – 4 флакона (по 4 мл).

Принадлежности:

– оптическая плёнка – 1 лист.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия, СОП ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* (СОП 05-2-351), с содержанием ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* 100 копий в пробе – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* определяется по четырем образцам, приготовленным из отрицательных сывороток стандартной панели предприятия, СПП ОКС (СПП 05-2-214) – 100%.

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

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*: клинические испытания, проведенные на 138 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97,9 %-100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*: клинические испытания, проведенные на 132 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,8 %-100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

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

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР/ОТ-ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

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

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»)*.

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

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

назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:

«iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– дозаторы механические, одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «FinnTip», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный);

– нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из биологического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000» согласно инструкциям по применению. При приготовлении суспензии клещей используется РПО. После вскрытия флакона срок годности РПО составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом

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

набора для выделения ДНК.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

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

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 ºС – 2 минуты;

2 стадия: 95 ºС – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 ºС – 10 секунд, 60 ºС – 20 секунд).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*:

«FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«ROX» – для регистрации сигнала ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положитель-

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

ным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла Ct ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* (канал «ROX») и определять значение порогового цикла Ct ПКО.

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

Если для ОКО значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4.).

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

8.2. Учёт результатов.

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

8.2.2. Анализируемый образец считается положительным (содержащим ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*) если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» меньше или равно 40.

8.3.3. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*) если для этого образца значение Ct по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО превышает значение $(Ct\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

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

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

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

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

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

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

По вопросам, касающимся качества набора **«РеалБест ДНК Borrelia burgdorferi s. l.»**, обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,
тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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

ПРИЛОЖЕНИЕ

Подготовка суспензий клещей.

Для очищения клещей от загрязнений веществами, использованными для удаления присосавшихся особей (масло, крем и т.п.), перед приготовлением суспензии следует провести их промывку (см. пункт а). В случае если клещ не загрязнён, можно сразу приступить к приготовлению суспензии (см. пункты б или в).

а) Предварительная промывка клещей: Исследуемых клещей поместить в пронумерованные пробирки типа *Eppendorf* объёмом 1,5 мл. Добавить в каждую пробирку с клещом **300 мкл 96% этанола**, встряхнуть пробирки на шейкере, коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок и удалить спирт с помощью дозатора или вакуумного отсасывателя, не касаясь клеща, используя отдельные наконечники для каждой пробы. Далее внести в пробирки по **500 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия**, встряхнуть пробирки на шейкере и сбросить капли со стенок пробирок коротким центрифугированием; удалить жидкость из пробирок с помощью дозатора или вакуумного отсасывателя, используя отдельные наконечники для каждой пробы.

Внимание! Для исследования методом ПЦР пригодны недавно погибшие клещи, в том числе высушенные и поврежденные.

Клеща, напитавшегося крови и имеющего размер, сопоставимый с диаметром пробирки, рекомендуется перед гомогенизацией проколоть одноразовой иглой или наконечником для дозатора для выхода крови.

Для предотвращения деградации нуклеиновых кислот (НК), содержащихся в клещах, следует использовать предварительно охлаждённый до температуры (2−8) °С раствор для подготовки образцов (РПО).

б) Приготовление суспензии клещей вручную:

Метод 1: Заморозить пробирки с клещами в жидком азоте (*не менее 5 минут)*. Достать одну замороженную пробирку и сразу тщательно измельчить клеща, с помощью отдельного стерильного пестика, совмещая вращательные движения с надавливанием. Не вынимая пестик, поставить пробирку с измельчённым клещом в штатив, помещённый в лёд. Добавить в пробирку 250 мкл охлаждённого РПО. Аккуратно ополоснув пестик в содержимом пробирки, вынуть его и поместить в дезинфицирующий раствор.

Перемешать содержимое пробирки на шейкере *(5-10 секунд).* Провести процедуру измельчения с остальными образцами. Коротким центрифугированием сбросить содержимое со стенок на дно пробирки и, не задевая осадка, отобрать 100 мкл суспензии для выделения НК и проведения анализа.

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

Метод 2: В пробирки с клещами внести по 30 мкл раствора РПО *(в случае анализа напитавшихся клещей, клещей больших размеров внести по 50 мкл РПО)*. Поместить пробирки в охлаждённый до минус (20-30)°С штатив-холодильник или штатив плавающий *(с предварительно сформированными лунками)*, и выдержать в морозильной камере не менее 20 минут при минус (20-30)°С. Далее поместить штатив с анализируемыми образцами в ёмкость со льдом или на хладоэлемент. Достать одну пробирку с клещом, замороженным в РПО, и максимально быстро, не дожидаясь оттаивания раствора, тщательно измельчить клеща с помощью отдельного стерильного пестика. Не вынимая пестик, поставить пробирку с измельчённым клещом в штатив, помещённый в лёд. Добавить в пробирку 200 мкл охлаждённого РПО. Аккуратно ополоснув пестик в содержимом пробирки, вынуть его и поместить в дезинфицирующий раствор.

Перемешать содержимое пробирки на шейкере *(5-10 секунд)*. Провести процедуру измельчения с остальными образцами. Коротким центрифугированием сбросить содержимое со стенок на дно пробирки и, не задевая осадка, отобрать 100 мкл суспензии для выделения НК и проведения анализа.

в) Приготовление суспензий клещей с помощью электромеханического гомогенизатора MagNA Lyser («Roche Diagnostics», Швейцария) либо его аналогов:

Перед началом работы установить пробирки с керамическими шариками («Шарики керамические калиброванные», ЗАО «Вектор-Бест»), согласно числу исследуемых проб, в штатив-охладитель. В каждую пробирку добавить по 300 мкл РПО, внести анализируемого клеща и закрыть пробирку крышкой. Установить пробирки (до 16 шт.) в ротор гомогенизатора и закрепить ротор согласно инструкции к прибору. Провести гомогенизацию образцов при 7000 об./мин в течение 90 секунд.

Внимание! Для обеспечения биологической безопасности и предотвращения контаминации перед открытием гомогенизатора следует убедиться через окно в крышке, что не произошла утечка материала из пробирок. В случае появления капель или аэрозоля в рабочей камере следует переместить закрытый гомогенизатор в ламинарный бокс, выждать 30-40 минут для оседания аэрозоля, открыть и обработать прибор в соответствии с инструкциями по работе с потенциально инфекционным материалом и инструкцией по дезинфекции, приведенной в руководстве оператора.

После окончания процесса, извлечь пробирки из прибора и поместить в охлажденный штатив.

В случае недостаточного измельчения отдельных образцов, повторить для них процедуру гомогенизации.

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

Сбросить капли суспензии со стенок пробирок кратковременным центрифугированием. Для выделения НК с помощью набора «РеалБест экстракция 100» использовать 100 мкл супернатанта.

<u>Внимание!</u> При анализе крупных клещей (размером более 5 мм), например, представителей родов Dermacentor и Hyalomma, а также в случае подготовки клещей, напившихся крови, после гомогенизации, следует дополнительно внести в пробирки по 300 мкл РПО.

Хранение клещей:

– при температуре (2−8) °С – в течение 3 суток;

– при температуре минус (18−60) °С – в течение 2 недель;

– при температуре минус 70 °С и ниже – в течение 1 года.

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

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____М.Д. Хусаинов
«__28__» _____ 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК боррелий комплекса Borrelia burgdorferi sensu lato методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК Borrelia burgdorferi s. l.»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК боррелий комплекса Borrelia burgdorferi sensu lato методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК Borrelia burgdorferi s. l.» предназначен для выявления ДНК патогенных для человека видов боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из биологических проб проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000». Набор реагентов «РеалБест ДНК Borrelia burgdorferi s. l.» может быть применён для анализа клинического материала, а также клещей.

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма «Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия), так и планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая контрольные.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

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

2.1. Принцип метода.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров ДНК-полимеразой.

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

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

– положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка (1 мл);

– реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 5 пробирок, каждая на 10 определений;

– раствор для восстановления (РВ) – 1 флакон (2 мл);

– раствор для подготовки образцов (РПО) – 4 флакона (по 4 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* определяется по пяти образцам, приготовленным из стандартного образца предприятия, СОП ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* (СОП 05-2-351), с содержанием ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* 100 копий в пробе – 100%.

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

3.2. Специфичность выявления ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* определяется по четырем образцам, приготовленным из отрицательных сывороток стандартной панели предприятия, СПП ОКС (СПП 05-2-214) – 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*: клинические испытания, проведенные на 138 положительных образцах, показали 100 % чувствительность (интервал 97,9 %-100 %, с доверительной вероятностью 90 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*: клинические испытания, проведенные на 132 отрицательных образцах, показали 100 % специфичность (интервал 97,8 %-100 %, с доверительной вероятностью 90 %).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

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

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР/ОТ-ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

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

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

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

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами *(такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»)*.

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

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

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма «Corbett Research», Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма «Qiagen», Германия) или планшетного типа: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– дозаторы механические, одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером (например, фирма «FinnTip», Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «Хеликон», Россия);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный);

– пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (например, фирма «Axygen», США).

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из биологического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» или «РеалБест экстракция 1000» согласно инструкциям по применению. При приготовлении суспензии клещей исполь-

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

зуется РПО. После вскрытия флакона срок годности РПО составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

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

Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку, отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с РС и выдержать их при температуре (18-25) °С в течение 30 минут.

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 определений.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при температуре хранения (2-8) °С.

6.2.2. В пробирку с РС добавить 300 мкл РВ, аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при температуре (18-25) °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

РВ после вскрытия флакона хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

Восстановленную РС использовать в день проведения анализа.

6.2.3. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18-24) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли).

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.2. Во все пробирки дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по 25 мкл РС.

7.3. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. Плотно закрыть пробирки крышками.

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

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

– для приборов «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»:

1 стадия: 50 ºС – 2 минуты;

2 стадия: 95 ºС – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 ºС – 10 секунд, 60 ºС – 40 секунд);

– для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 50 ºС – 2 минуты;

2 стадия: 95 ºС – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 ºС – 10 секунд, 60 ºС – 20 секунд);

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*:

«FAM» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«ROX» (для приборов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q») – для регистрации сигнала ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

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

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять значение порогового цикла Ct ВКО.

– нарастание сигнала амплификации ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.* (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла Ct ПКО;

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») и определять Ct ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу

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

«ROX»/«Orange».

Если для ОКО значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4).

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

8.2. Учёт результатов.

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

8.2.2. Анализируемый образец считается положительным (содержащим ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» меньше или равно 40.

8.2.3. Результат анализа образца считается отрицательным (не содержащим ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*), если для этого образца значение Ct по каналу «ROX»/«Orange» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение Ct ВКО превышает значение $(Ct\ ВКО)_{ср}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

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

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

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

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

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

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

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

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

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

По вопросам, касающимся качества набора **«РеалБест ДНК Borrelia burgdorferi s. l.»**, обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211,
тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

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

ПРИЛОЖЕНИЕ

Подготовка суспензий клещей.

Для очищения клещей от загрязнений веществами, использованными для удаления присосавшихся особей (масло, крем и т.п.), перед приготовлением суспензии следует провести их промывку (см. пункт а). В случае если клещ не загрязнён, можно сразу приступить к приготовлению суспензии (см. пункты б или в).

а) Предварительная промывка клещей: Исследуемых клещей поместить в пронумерованные пробирки типа *Eppendorf* объёмом 1,5 мл. Добавить в каждую пробирку с клещом **300 мкл 96% этанола**, встряхнуть пробирки на шейкере, коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок и удалить спирт с помощью дозатора или вакуумного отсасывателя, не касаясь клеща, используя отдельные наконечники для каждой пробы. Далее внести в пробирки по **500 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия**, встряхнуть пробирки на шейкере и сбросить капли со стенок пробирок коротким центрифугированием; удалить жидкость из пробирок с помощью дозатора или вакуумного отсасывателя, используя отдельные наконечники для каждой пробы.

Внимание! Для исследования методом ПЦР пригодны недавно погибшие клещи, в том числе высушенные и поврежденные.

Клеща, напитавшегося крови и имеющего размер, сопоставимый с диаметром пробирки, рекомендуется перед гомогенизацией проколоть одноразовой иглой или наконечником для дозатора для выхода крови.

Для предотвращения деградации нуклеиновых кислот (НК), содержащихся в клещах, следует использовать предварительно охлаждённый до температуры (2−8) °С раствор для подготовки образцов (РПО).

б) Приготовление суспензии клещей вручную:

Метод 1: Заморозить пробирки с клещами в жидком азоте (*не менее 5 минут)*. Достать одну замороженную пробирку и сразу тщательно измельчить клеща, с помощью отдельного стерильного пестика, совмещая вращательные движения с надавливанием. Не вынимая пестик, поставить пробирку с измельчённым клещом в штатив, помещённый в лёд. Добавить в пробирку 250 мкл охлаждённого РПО. Аккуратно ополоснув пестик в содержимом пробирки, вынуть его и поместить в дезинфицирующий раствор.

Перемешать содержимое пробирки на шейкере *(5-10 секунд).* Провести процедуру измельчения с остальными образцами. Коротким центрифугированием сбросить содержимое со стенок на дно пробирки и, не задевая осадка, отобрать 100 мкл суспензии для выделения НК и проведения анализа.

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

Метод 2: В пробирки с клещами внести по 30 мкл раствора РПО *(в случае анализа напитавшихся клещей, клещей больших размеров внести по 50 мкл РПО)*. Поместить пробирки в охлаждённый до минус (20-30)°С штатив-холодильник или штатив плавающий *(с предварительно сформированными лунками)*, и выдержать в морозильной камере не менее 20 минут при минус (20-30)°С. Далее поместить штатив с анализируемыми образцами в ёмкость со льдом или на хладоэлемент. Достать одну пробирку с клещом, замороженным в РПО, и максимально быстро, не дожидаясь оттаивания раствора, тщательно измельчить клеща с помощью отдельного стерильного пестика. Не вынимая пестик, поставить пробирку с измельчённым клещом в штатив, помещённый в лёд. Добавить в пробирку 200 мкл охлаждённого РПО. Аккуратно ополоснув пестик в содержимом пробирки, вынуть его и поместить в дезинфицирующий раствор.

Перемешать содержимое пробирки на шейкере *(5-10 секунд)*. Провести процедуру измельчения с остальными образцами. Коротким центрифугированием сбросить содержимое со стенок на дно пробирки и, не задевая осадка, отобрать 100 мкл суспензии для выделения НК и проведения анализа.

в) Приготовление суспензий клещей с помощью электромеханического гомогенизатора MagNA Lyser («Roche Diagnostics», Швейцария) либо его аналогов:

Перед началом работы установить пробирки с керамическими шариками («Шарики керамические калиброванные», ЗАО «Вектор-Бест»), согласно числу исследуемых проб, в штатив-охладитель. В каждую пробирку добавить по 300 мкл РПО, внести анализируемого клеща и закрыть пробирку крышкой. Установить пробирки (до 16 шт.) в ротор гомогенизатора и закрепить ротор согласно инструкции к прибору. Провести гомогенизацию образцов при 7000 об./мин в течение 90 секунд.

Внимание! Для обеспечения биологической безопасности и предотвращения контаминации перед открытием гомогенизатора следует убедиться через окно в крышке, что не произошла утечка материала из пробирок. В случае появления капель или аэрозоля в рабочей камере следует переместить закрытый гомогенизатор в ламинарный бокс, выждать 30-40 минут для оседания аэрозоля, открыть и обработать прибор в соответствии с инструкциями по работе с потенциально инфекционным материалом и инструкцией по дезинфекции, приведенной в руководстве оператора.

После окончания процесса, извлечь пробирки из прибора и поместить в охлажденный штатив.

В случае недостаточного измельчения отдельных образцов, повторить для них процедуру гомогенизации.

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

Сбросить капли суспензии со стенок пробирок кратковременным центрифугированием. Для выделения НК с помощью набора «РеалБест экстракция 100» использовать 100 мкл супернатанта.

<u>Внимание!</u> При анализе крупных клещей (размером более 5 мм), например, представителей родов Dermacentor и Hyalomma, а также в случае подготовки клещей, напившихся крови, после гомогенизации, следует дополнительно внести в пробирки по 300 мкл РПО.

Хранение клещей:

– при температуре (2−8) °С – в течение 3 суток;

– при температуре минус (18−60) °С – в течение 2 недель;

– при температуре минус 70 °С и ниже – в течение 1 года.

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