УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.И.Покровский
«14» февраля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций,
передающихся иксодовыми клещами
TBEV, *Borellia 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®

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 6
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК 9
ФОРМАТ FRT 11
СОСТАВ 11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 12
ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 13
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ 13
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 13
А. Подготовка пробирок для амплификации 13
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени» 14
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 19
ПРИЛОЖЕНИЕ 21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 23

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО STI-87-rec	- внутренний контрольный образец
В–	- отрицательный контроль экстракции РНК/ДНК
К–	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
кДНК	- комплементарная ДНК, получаемая в реакции обратной транскрипции на матрице РНК
НК	- нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК)
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris*-FL»** предназначен для выявления РНК *TBEV* – вируса клещевого энцефалита (Tick-borne encephalitis virus), *Borrelia burgdorferi sl* – возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), *Ehrlichia chaffeensis u Ehrlichia muris* – возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), ДНК *Anaplasma phagocytophilum* – возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) в клещах, крови, ликворе, аутоптатах методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.[1]

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя следующие этапы: экстракцию РНК/ДНК из образцов биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции и получение кДНК на матрице РНК, амплификацию участка кДНК/ДНК данных микроорганизмов и

[1] В соответствии с директивой Европейского Союза 98/79/ЕС

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

гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция РНК/ДНК из биологического материала проводится с использованием наборов реагентов, рекомендованных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в присутствии внутреннего контрольного образца (**ВКО-STI-87-rec**), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами проводятся реакции обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК/ДНК *TBEV, B.burgdorferi sl, E.chaffeensis / E.muris* при помощи специфичных к этим участкам кДНК/ДНК праймеров и фермента TaqF-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарными участками амплифицируемых кДНК/ДНК-мишеней, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов происходит непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

<u>Формат FRT</u>

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «РЕВЕРТА-L» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

Форма 3 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию РНК/ДНК из биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции и получение кДНК на матрице РНК и

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

амплификацию кДНК/ДНК *TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Форма комплектации 2 предназначена для амплификации кДНК/ДНК *TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для проведения реакции обратной транскрипции и комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 3 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Комплект для обратной транскрипции	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность	Пробоподготовка материала
Клещи родов Ixodes, Dermacentor	«РИБО-преп»	«РЕВЕРТА-L»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	$5x10^3$ ГЭ/мл для всех заявленных микроорганизмов	Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом исследуемом объеме пробы

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на:

– флавивирусах (вирус Западного Нила, Лангат, Повассан, Японского энцефалита, Омской геморрагической лихорадки);

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

– спирохетах (*Borrelia miyamotoi*, *Treponema pallidum*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirshneri*, *Leptospira borgpetersenii*);
– риккетсиях группы пятнистых лихорадок (*Rickettsia conorii subsp caspia*, *R.heilongiangensis*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*).

При работе с ДНК вышеперечисленных организмов, ДНК человека, ДНК клещей *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus*, ДНК грызунов *Clethrionomys glareolus* и *Apodemus agrarius* не выявлено ложноположительных результатов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

ВНИМАНИЕ! При работе с клещом с высокой степенью напитанности рекомендуется перед гомогенизацией проколоть его одноразовой иглой для выхода крови и предупреждения разбрызгивания материала при растирании в ступке.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и

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

возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. 0,15 М NaCl или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2мМ; pH=7,5±0,2) и 96% этиловый спирт для проведения пробоподготовки клещей и суспензии органов, глицерин.
2. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) – при работе с формой комплектации 2.
3. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции

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

РНК/ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК.

4. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции «РЕВЕРТА-L» (ТУ 9398-005-01897593-2008) – при работе с формой комплектации 2.
5. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
6. Центрифуга/вортекс.
7. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
9. Штативы для пробирок объемом 0,1 мл, 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.
12. Емкость для сброса наконечников.
13. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
14. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл:
    а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axygen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
    б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, США), или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene, объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками (например, Corbett Research, Австралия) – при использовании прибора роторного типа.

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

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Осуществляется в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК/ДНК

Подготовка суспензий клещей.

При исследовании пулов клещей число особей в одном пуле не должно превышать 10. Особей клещей рода *Dermacentor* предпочтительнее исследовать индивидуально. Исследуемых клещей помещают в пробирки типа «Эппендорф», добавляют 500 мкл 96 % этанола и встряхивают на вортексе. Пробирку центрифугируют в течение 3-5 с на микроцентрифуге типа вортекс для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки, после чего жидкость аккуратно забирают с помощью вакуумного отсасывателя. Затем в пробирку с клещами добавляют 500 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия или фосфатного буфера, встряхивают на вортексе, центрифугируют в течение 3-5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки, после чего жидкость аккуратно забирают с помощью вакуумного отсасывателя. Для приготовления суспензий клещей используют стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. Клещей растирают в 300 мкл (если проба состоит из одного клеща *Ixodes*), в 500 мкл (при исследовании клеща рода *Dermacentor*) или в 1 мл (если гомогенизируют пул клещей) 0,15 М раствора хлорида натрия или фосфатного буфера, затем полученную суспензию центрифугируют при 5 тыс об/мин в течение 2 мин и отбирают 100 мкл надосадочной жидкости для экстракции РНК/ДНК из клещей *Ixodes* и 50 мкл для экстракции РНК/ДНК из клещей *Dermacentor*. В оставшийся объем суспензии вносят глицерол (10% по объему), пробу перемешивают и замораживают при температуре не выше минус 16 °С для последующего исследования.

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

Лейкоцитарная фракция крови и СМЖ

Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6% раствором ЭДТА в соотношении 1:20. Закрытую пробирку несколько раз переворачивают. Для получения лейкоцитарной фракции крови в пробирку типа «Эппендорф» вносят 1,5 мл цельной крови, взятой с ЭДТА, и центрифугируют при 800 об/мин в течение 10 мин; затем верхний слой плазмы (500-600 мкл) с лейкоцитами переносят во вторую пробирку типа «Эппендорф» и центрифугируют при 13 000 об/мин в течение 10 мин. Оставшуюся надосадочную жидкость переносят в контейнер с дезраствором, а осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции РНК/ДНК.

1-1,5 мл ликвора центрифугируют при 13 000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость переносят в контейнер с дезраствором, а осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости используют для экстракции РНК/ДНК.

Внутренние органы животных и секционный материал гомогенизируют в стерильной фарфоровой ступке и готовят 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе (0,15 М раствор хлорида натрия), или фосфатном буфере. Для экстракции РНК/ДНК берут 50 мкл суспензии.

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

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем,мл*	*Кол-во*
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета[2]	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в форму комплектации 1.

Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» вариант 50 – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	5 пробирок
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	5 пробирок
Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций обратной транскрипции, включая контроли. Входит в форму комплектации 1.

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

[2] При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

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

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FRT *B.b. sl* / ВКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПКО кДНК *TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m.* / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции РНК/ДНК:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ВКО STI-87-rec	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция РНК/ДНК из исследуемых образцов.
- Получение кДНК на матрице РНК.
- Проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от типа используемого оборудования изложена в методических рекомендациях ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами *TBEV*, *Borellia 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».

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции РНК/ДНК используется комплект реагентов, рекомендованный ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с **приложением** к данной инструкции. Экстракция РНК/ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО-STI-87-rec**.

При использовании формы комплектации набора 1 для экстракции РНК/ДНК используется входящий в набор комплект реагентов «РИБО-преп».

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Для получения кДНК на матрице РНК используется комплект реагентов, рекомендованный ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому набору.

При использовании формы комплектации 1 для реакции обратной транскрипции используется входящий в набор комплект реагентов «РЕВЕРТА-L».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ 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 кДНК/ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

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

ВНИМАНИЕ! Полученная кДНК/ДНК 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.**

А. Подготовка пробирок для амплификации

1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций: смешать в отдельной пробирке **ПЦР-смесь-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*, полимеразу (TaqF), ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT**, в другой пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FRT *B.b. sl* / ВКО, полимеразу (TaqF)** и **ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT** из расчета на каждую реакцию:

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

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** или **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО**;
- **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT**;
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF)**.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь не хранить.

ВНИМАНИЕ! При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается амплификацией как минимум шести контрольных точек: отрицательного контроля экстракции (В–), положительного и отрицательного контролей ОТ-ПЦР (К+ и К–) для двух смесей – **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** и **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО**.

2. Раскапать приготовленные смеси в пробирки по **15 мкл**.
3. Используя наконечник с фильтром, добавить **10 мкл пробы кДНК/ДНК** в пробирки с каждой реакционной смесью. Осторожно перемешать пипетированием.
4. Для каждой панели исследуемых образцов необходимо поставить контроли амплификации кДНК/ДНК:
   а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
   б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m.* / STI**.

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси, с пробами кДНК/ДНК и контролями.

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

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала:

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

	Приборы роторного типа[3]			Приборы планшетного типа[4]		
Цикл	***Температура, °С***	***Время***	***Кол-во циклов***	***Температура, °С***	***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 для пробирок с **ПЦР-смесью-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** и по каналам FAM, JOE для пробирок с **ПЦР-смесью-1-FRT *B.b. sl* / ВКО**.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. Первыми в ячейки прибора ставятся пробирки с **ПЦР-смесью-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** в том случае, если амплификация будет проводиться одновременно с двумя видами ПЦР-смесей.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и учету результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируют по трем и двум каналам соответственно для каждого вида ПЦР-смеси:

- Для **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации

[3] Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

[4] Например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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

фрагмента кДНК *TBEV,* по каналу JOE – ДНК *A.phagocytophilum*, по каналу ROX – кДНК *E.chaffeensis/E.muris*.

- Для **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации кДНК ВКО, по каналу JOE – кДНК *B.burgdorferi sl***.**

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК/ДНК значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- кДНК *TBEV* **обнаружена***,* если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*.
- ДНК *A.phagocytophilum* **обнаружена**, если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*.
- кДНК *E.chaffeensis/E.muris* **обнаружена**, если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора ROX определено значение порогового цикла *Ct*.
- кДНК *B.burgdorferi sl* **обнаружена**, если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*.

При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- кДНК *B.burgdorferi sl* **не обнаружена,** если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE не определено

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

значение порогового цикла *Ct,* а по каналу FAM определено значение, не превышающее граничное.

- кДНК/ДНК *TBEV, A.phagocytophilum* и *E.chaffeensis/E.muris* **не обнаружена** если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** для данной пробы в таблице результатов по каналу, по которому осуществляется детекция специфического сигнала, не определено значение порогового цикла.
- Результат анализа **невалидный,** если для данной пробы значение порогового цикла *Ct* по каналу для регистрации специфического сигнала не определено (отсутствует) и если при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl* / ВКО** значение *Ct* по каналу для флуорофора FAM также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту. См. также методические рекомендации ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора по применению набора реагентов для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами *TBEV*, *Borellia 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».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 1).

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

Таблица 1

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, *Ct* (по всем каналам)
ПЦР-смесь-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch./E.m.*	В–	**Экстракция РНК/ДНК**	По всем каналам **значение отсутствует**
	К–	**ПЦР**	По всем каналам **значение отсутствует**
	К+	**ПЦР**	По всем каналам **определено значение меньше граничного**
ПЦР-смесь-1-FRT *B.b. sl*/ВКО	В–	**Экстракция РНК/ДНК**	По каналу JOE **значение отсутствует**, по каналу FAM **определено значение меньше граничного**
	К–	**ПЦР**	По всем каналам **значение отсутствует**
	К+	**ПЦР**	По всем каналам **определено значение меньше граничного**

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла 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 для всех образцов, в которых не обнаружена специфическая кДНК или ДНК, детектируемая по данному каналу (или каналам).
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК/ДНК (В–) (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 (К–) (по всем каналам) определено значение порогового цикла *Ct,* необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК или кДНК, детекируемая по данному каналу (или каналам).

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 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. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «РЕВЕРТА-L» хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. Комплекты реагентов «РИБО-преп» и «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*, ПЦР-смесь-1-FRT *B.burgdorferi sl /* ВКО, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT и полимеразу (TaqF) (из «ПЦР-комплекта») хранить при температуре от минус 24 °С 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.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

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

Рекламации на качество набора реагентов «**АмплиСенс**® ***TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris*-FL**» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)[5].

Заведующий НПЛ ОМДиЭ Е.Н. Родионова
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1» Е.Л.Никонов
Управления делами Президента Российской Федерации

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

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

ПРИЛОЖЕНИЕ

Экстракция РНК/ДНК из исследуемого материала

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. В пробирки с исследуемым материалом **(концентрированный осадок клеток СМЖ, лейкоцитарный осадок крови, гомогенат внутренних органов, осветленная суспензия клещей)** и в пробирку В– (отрицательный контроль экстракции) внести по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки. Содержимое пробирок тщательно перемешать и центрифугировать при **5 тыс об/мин** в течение **5 с** для стряхивания капель с крышек пробирок.
3. Внести в пробирки отдельными наконечниками по **10 мкл** внутреннего контрольного образца (**ВКО STI-87-rec)**. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин** при 65 °С в термостате.
4. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
5. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин.**
6. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.
7. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок; для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
8. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
9. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать супернатант, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.

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

10. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
11. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
12. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.
13. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
14. При экстракция РНК/ДНК из **сконцентрированного осадка клеток СМЖ, лейкоцитарного осадка крови** внести в пробирки по **100 мкл РНК-буфера** , при экстракции из гомогената тканей и клещей – по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на **5-10 мин**, периодически встряхивая на вортексе.

Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер в каталоге		Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации
LOT	Код партии		Максимальное число тестов
IVD	Изделие для in vitro диагностики		Использовать до
VER	Дата изменения		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Ограничение температуры		Не допускать попадания солнечного света
	Производитель		Дата изготовления

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