

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[®]



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



Только для исследовательских и
иных немедицинских целей

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	8
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	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	14
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	15
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	19
ПРИЛОЖЕНИЕ. Экстракция РНК/ДНК из исследуемого материала	20
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	22

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* и *Ehrlichia muris* – возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), ДНК *Anaplasma phagocytophilum* – возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) в клещах, крови, ликворе, аутоптатах методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-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 гибридационно-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.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «РЕВЕРТА-L» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 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 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 <i>Ixodes</i> , <i>Dermacentor</i>	«РИБО-преп»	«РЕВЕРТ А-Л»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	5×10^3 ГЭ/мл для всех заявленных микроорганизмов ¹	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);
- спирохетах (*Borrelia miyamotoi*, *Treponema pallidum*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirshneri*, *Leptospira*

¹ Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала, помещенного в указанную транспортную среду.

borgpetersenii);

– риккетсиях группы пятнистых лихорадок (*Rickettsia conorii subsp caspia*, *R.heilongiagensis*, *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 питанности 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 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; рН=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 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, Ахуген, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Ахуген, 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.

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.

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.

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

«РИБО-преп» вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем,мл</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость от бесцветного до серо-голубого цвета ²	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в форму комплектации 1.

«РЕВЕРТА-L» вариант 100 – комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	10 пробирок
RT-mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	10 пробирок
Ревертаза (MMIV)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 120 реакций обратной транскрипции, включая контроли. Входит в форму комплектации 1.

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

«ПЦР-комплект» вариант FRT-100 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:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT <i>TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	2 пробирки
ПЦР-смесь-1-FRT <i>B.b. sl / ВКО</i>	Прозрачная жидкость от бесцветного до светло-лилового цвета	0,6	2 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	4 пробирки
ПКО кДНК <i>TBEV, B.b. sl, A.ph., E.ch. / E.m. / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 120 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	10 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».

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 пробы кДНК/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:
 - 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:

ФОРМАТ FRT

Цикл	Приборы роторного типа ³			Приборы планшетного типа ⁴		
	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.**

- 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.
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- 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.

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 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 гибридационно-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).

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

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

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) 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 (B-) (по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *TBEV, A.ph., E.ch. / E.m.*** и по каналу для флуорофора JOE при использовании **ПЦР-смеси-1-FRT *B.b. sl / ВКО***) и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) (по всем каналам) определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК или кДНК, детектируемая по данному каналу (или каналам).

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 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-100 F при получении разукomплектовать 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.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г.Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru⁵.

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

ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК

10. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
11. Центрифугировать 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 экстракции 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.

Центрифугировать 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.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации

LOT

Код партии



Максимальное
число тестов

RUO

Только для
исследовательских и
иных немедицинских
целей



Использовать до

VER

Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Производитель



Дата
изготовления

Лист вносимых изменений

Редакция	Место внесения изменений	Суть вносимых изменений
28.08.14 PM	Титульный лист. Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удалены печати и подписи
	Символы, используемые в печатной продукции	Символ IVD заменен на RUO
28.01.15 ChA	Титульный лист	Для символа RUO добавлена надпись «Только для научно-исследовательских целей»
	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Изменен адресат для направления рекламаций
	Символы, используемые в печатной продукции	Для символа RUO изменена фраза с «Только для исследовательских целей» на «Только для научно-исследовательских целей»
04.02.15 BS	Назначение	Удалено: «ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания»
	Титульный лист	Для символа RUO изменена надпись «Только для научно-исследовательских целей» на «Только для исследовательских и иных немедицинских целей»
	Символы, используемые в печатной продукции	
09.02.15 PM	Срок годности. Условия транспортирования и хранения	Удален подраздел «Условия отпуска»
28.09.18 EM	Состав	Уточнены цвета реагентов
22.02.19 PM	Состав	Уточнен цвет реагента
	По тексту	Изменено форматирование текста
14.01.20 EM	Нижний колонтитул	Добавлен новый каталожный номер REF H-3932-1-0