

Набор реагентов для выявления ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*» по ТУ 21.20.23-223-09286667-2023

## АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*

# ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



---

## ОГЛАВЛЕНИЕ

---

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	3
1. НАЗНАЧЕНИЕ .....	4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА .....	4
2.1.Формы выпуска, состав и комплектность .....	4
2.2.Принцип метода .....	6
2.3.Техническое обслуживание и ремонт .....	7
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА .....	7
3.1.Внутренний контроль качества .....	7
3.2.Рекомендуемые контрольные материалы .....	8
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	8
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ .....	9
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	10
6.1.Взятие исследуемого материала.....	10
6.2.Предварительная подготовка исследуемого материала.....	11
6.3.Экстракция ДНК из исследуемых образцов .....	11
6.4.Аmplификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов .....	12
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ.....	13
7.1.Клещи.....	13
7.2.Цельная кровь.....	14
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
8.1.Экстракция ДНК из исследуемого материала.....	15
8.2.Подготовка реагентов для амплификации.....	15
8.3.Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции .....	16
8.4.Анализ и вычисление результатов.....	17
8.5.Интерпретация результатов .....	18
8.6.Возможные ошибки и рекомендации по их решению .....	19
8.7.Диагностическое значение полученного результата .....	19
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА .....	20
9.1.Предел обнаружения .....	20
9.2.Аналитическая специфичность.....	20
9.3.Воспроизводимость и повторяемость измерения .....	21
9.4.Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность .....	21
9.5.Оценка влияния интерферирующих веществ .....	22
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА.....	23
10.1.Срок годности.....	23
10.2.Транспортирование .....	23
10.3.Хранение.....	23
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ.....	23
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ .....	24

---

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

---

Сt	– Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	– внутренний контрольный образец
ГЭ	– геномные эквиваленты
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	– дезоксирибонуклеаза
дНТФ	– дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
К-	– отрицательный контроль ПЦР
ОКО	– отрицательный контрольный образец экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РУ	– регистрационное удостоверение
ТУ	– технические условия
УДГ	– урацил-ДНК-гликозилаза

---

## НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

---

Набор реагентов для выявления ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato* методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*» по ТУ 21.20.23-223-09286667-2023.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*», а также сокращение Набор реагентов.

---

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

---

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*» предназначен для выявления ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato* в биологическом материале (клещи, цельная кровь, плазма крови) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе инструкции «Дополнительное оборудование и материалы».

1.3. Функциональное назначение: Набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (выявление ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato* методом ПЦР в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для мониторинга клещевого иксодового боррелиоза в природных очагах опасных инфекционных болезней, а также для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на клещевой иксодовый боррелиоз вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, и для исследования клещей рода *Ixodes* (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*). Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.5. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6. Потенциальные пользователи: Набор реагентов должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

---

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

---

### 2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор реагентов выпускается в двух формах (состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все формы предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

**Форма выпуска 1** включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 или 2 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована как для ручной раскапки, так и совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

**Форма выпуска 2** включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

## Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
<b>Форма выпуска 1</b>			
ПЦР-смесь BbsI	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-буфер-H	0,65	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
ПКО BbsI	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО-FL	1,10	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
<b>Форма выпуска 2</b>			
ПЦР-смесь BbsI	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок) <sup>1</sup>	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и ДНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.
ПЦР-буфер-K	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
ПКО BbsI	0,26	1 пробирка	Положительный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ВКО-FL	1,10	1 пробирка	Внутренний контрольный образец. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

## Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1 или 2)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде <sup>2</sup> на официальном сайте Производителя: <a href="http://www.nextbio.ru">www.nextbio.ru</a>	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: <a href="http://www.nextbio.ru">www.nextbio.ru</a>	-

<sup>1</sup> Пробирки с голубым парафином не используются.

<sup>2</sup> Печатная версия инструкции доступна по запросу по телефону (495) 620-08-73.

## 2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на экстракции ДНК из образцов исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом (ВКО-FL<sup>3</sup>) и одновременной амплификации участков ДНК *B. burgdorferi sensu lato*, ДНК клещей рода *Ixodes* (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*) и искусственно синтезированной последовательности ДНК ВКО с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». ВКО позволяет контролировать все этапы ПЦР-исследования для каждого образца и оценивать влияние ингибиторов на результаты ПЦР-исследования. ДНК иксодовых клещей используется в качестве эндогенного внутреннего контроля и позволяет не только контролировать все этапы ПЦР-исследования для образцов клещей, но и оценивать качество выполнения пробоподготовки клещей, адекватность взятия биологического материала и его хранения.

С полученными на этапе экстракции пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК при помощи специфичных к этому участку праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термоллабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся 3 реакции - амплификация участков ДНК *B. burgdorferi sensu lato*, ДНК клещей рода *Ixodes* (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*) и последовательности ВКО-FL. Результаты амплификации регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

**Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции**

Канал для флуорофора	FAM	R6G <sup>4</sup>	Cy5
ДНК-мишень	ДНК <i>B. burgdorferi sensu lato</i>	ДНК <i>Ixodes persulcatus</i> , ДНК <i>Ixodes ricinus</i>	ДНК ВКО (экзогенный ВКО)
Область ампликации	23S rRNA gene	ITS2 gene	Искусственно синтезированная последовательность

<sup>3</sup> ВКО-FL входит в состав набора реагентов «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*».

<sup>4</sup> Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow и VIC.

## 2.3. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

---

## 3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

---

### 3.1. Внутренний контроль качества

#### 3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контрольный образец экстракции (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать: отрицательный контроль ПЦР (К-) и положительный контроль ПЦР (ПКО BbsI). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец экстракции (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должны детектироваться ДНК *B. burgdorferi sensu lato* и ДНК клещей рода *Ixodes* (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*). В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружены ДНК *B. burgdorferi sensu lato*, ДНК клещей рода *Ixodes* (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*), и контроля, начиная с этапа экстракции.

Отрицательный контроль ПЦР (К-) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должны детектироваться ДНК *B. burgdorferi sensu lato*, ДНК клещей рода *Ixodes* (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*) и ВКО-FL. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружены ДНК *B. burgdorferi sensu lato*, ДНК клещей рода *Ixodes* (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*), ВКО-FL, и контроля, начиная с этапа ПЦР.

В качестве положительного контроля ПЦР используется реагент ПКО BbsI, входящий в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительного контроля заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

#### 3.1.2. Контроль ингибирования

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование экзогенного ВКО, который добавляется в каждый исследуемый и отрицательный контрольный образец на этапе экстракции. Результаты исследования ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах, отрицательных на наличие ДНК *B. burgdorferi sensu lato*, не обнаружена ДНК ВКО, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа экстракции.

### 3.1.3. Контроль качества экстракции материала

Для контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК из клещей и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование эндогенного ВКО - ДНК клещей рода *Ixodes* (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*). Результаты исследования эндогенного ВКО должны соответствовать заданным критериям валидности для отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах, отрицательных на наличие ДНК *B. burgdorferi sensu lato*, не обнаружена ДНК клещей рода *Ixodes* (*Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*), то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить анализ, начиная с этапа экстракции.

### 3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

### 3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контроля качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК *B. burgdorferi sensu lato*.

---

## 4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Непригодными для исследования являются образцы цельной крови и плазмы крови, взятые в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта и образцы цельной крови, содержащие кровяной сгусток или подвергшиеся заморозке.

4.4. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.5. С помощью набора возможно ПЦР-исследование только проб ДНК, экстрагированных из исследуемого материала совместно с внутренним контрольным образцом – ВКО-FL. Без использования ВКО-FL невозможно провести оценку валидности постановки.



4.6. Набор предназначен для профессионального применения. Набор должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

4.7. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

4.8. Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

4.9. Не применять набор при нарушении целостности упаковки и с истекшим сроком годности.

---

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

---

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и 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».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку<sup>5</sup>, биологический материал<sup>6</sup>, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

**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.

---

<sup>5</sup> Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

<sup>6</sup> Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Формы выпуска, состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности, кроме указанных в данном разделе.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

---

## **6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

---

### **6.1. Взятие исследуемого материала**

6.1.1. Двухсторонняя игла для взятия крови в вакуумную пробирку, одноразовая, стерильная.

6.1.2. Вакуумные пробирки для взятия крови с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитратом натрия).

6.1.3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

6.1.4. Медицинские одноразовые стерильные пинцеты.

## **6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала**

### **6.2.1. Предварительная обработка клещей**

6.2.1.1. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

6.2.1.2. Фарфоровые ступки и песты.

6.2.1.3. 0,15 М раствор хлорида натрия.

6.2.1.4. 96 % раствор этанола.

6.2.1.5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.1.6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

6.2.1.7. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.2.1.8. Автоматический дозатор переменного объема на 200 мкл.

6.2.1.9. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 или 2,0 мл с ускорением не менее 10000 g.

6.2.1.10. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.2.1.11. Вортекс.

6.2.1.12. Медицинские одноразовые стерильные пинцеты.

### **6.2.2. Предварительная обработка крови для получения плазмы**

6.2.2.1. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.2.2. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.2.2.3. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

6.2.2.4. Центрифуга для вакуумных пробирок с ускорением не менее 600 g.

## **6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов**

6.3.1. Набор реагентов для экстракции нуклеиновых кислот, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (клещи, цельная кровь, плазма крови) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 50 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли «МагноПрайм ЮНИ» (РУ № РЗН 2019/8955) и «АмплиПрайм РИБО-преп» (РУ № ФСР 2012/14017) (в соответствии с таблицей 4).

Таблица 4

### **Рекомендуемые наборы для экстракции ДНК**

<b>Биоматериал</b>	<b>Набор для экстракции</b>
Клещи, цельная кровь, плазма крови	МагноПрайм ЮНИ
Клещи, плазма крови	АмплиПрайм РИБО-преп

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

#### **6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов**

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при работе с формой выпуска 1):

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 - 2 мл – для приготовления реакционной смеси;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и дозирования реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при работе с формой выпуска 1 в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного либо планшетного типа, зарегистрированные в РФ и соответствующие следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G и Cy5 со следующими характеристиками:

Таблица 5

#### **Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции**

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
Cy5	620	640	660	690

- для приборов планшетного типа верхняя граница температурного диапазона не менее 99 °С;
- точность поддержания температуры  $\leq \pm 0,5$  °С;
- скорость нагрева не менее 1,5 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399), ДТпрайм (РУ № ФСР 2011/10229), Lergen-96 (РУ № РЗН 2023/21155).

6.4.9. Холодильник, поддерживающий температурный режим от 2 до 8 °С.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

---

## 7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

---

Материалом для исследования служат:

- клещи;
- цельная кровь, плазма крови.

Взятие, предварительную обработку, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

### 7.1. Клещи

#### 7.1.1. Взятие материала

Собранный материал разбирают в лаборатории по видам, полу, местам и датам сбора и помещают с помощью пинцета в сухие чистые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Группировку проб осуществляют в соответствии с МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней».

Допускается хранение и транспортирование материала после разбора и формирования проб:

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

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

#### 7.1.2. Предварительная обработка

Клещей поместить в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл, куда внести 500 мкл 96 % раствора этанола, перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 3-5 с при 2000 g для осаждения капель с крышек пробирок. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удалить спирт из пробирок.

Внести в каждую пробирку 500 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия, встряхнуть пробирки и осадить капли с крышек пробирок на микроцентрифуге в течение 3-5 с при 2000 g. С помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удалить раствор хлорида натрия из пробирок.

Перенести клещей в стерильную фарфоровую ступку, добавить 500 мкл (если проба состоит из одного клеща рода *Ixodes*) или 1 мл (если гомогенизируют пул клещей) 0,15 М раствора хлорида натрия и гомогенизировать пробу.

Перенести пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 или 2,0 мл, используя наконечник с фильтром, и центрифугировать при 1200 g в течение 2 мин для осветления пробы.

ДНК выделяют из 0,1 мл надосадочной жидкости.

Допускается хранение и транспортирование предварительно обработанных клещей до проведения ПЦР-исследования:

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

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

## **7.2. Цельная кровь**

### **7.2.1. Взятие материала**

Взятие крови проводится натошак или через 3 часа после приема пищи в пробирку с антикоагулянтом (раствором ЭДТА или цитрата натрия).

**ВНИМАНИЕ!** Недопустимо использовать гепарин в качестве антикоагулянта.

Для тщательного перемешивания крови с антикоагулянтом необходимо несколько раз перевернуть пробирку.

Допускается хранение и транспортирование образцов цельной крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 18 до 25 °С – в течение 2 часов с момента получения материала;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток с момента получения материала.

**ВНИМАНИЕ!** Недопустимо замораживание образцов цельной крови.

### **7.2.2. Предварительная обработка для получения плазмы крови**

Пробирки с цельной кровью центрифугировать 10 мин при 600 g при температуре 18-25 °С. Затем отобрать плазму в количестве не менее 1 мл с использованием отдельного для каждого образца наконечника с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

Допускается хранение и транспортирование образцов плазмы крови до проведения ПЦР-исследования:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 5 суток;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 3 месяцев;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинично-диагностической лаборатории<sup>7</sup>:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

### 8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

**ВНИМАНИЕ!** При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

**ВНИМАНИЕ!** Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) в одном повторе.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем реагента ВКО-FL – **10 мкл** в пробирку для ОКО, а также в каждую пробирку с исследуемыми образцами;
- объем исследуемого образца – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **50 мкл**<sup>8</sup> (при использовании комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп») или **100 мкл** (при использовании набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ»).

### 8.2. Подготовка реагентов для амплификации

#### 8.2.1. При использовании формы выпуска 1

**ВНИМАНИЕ!** Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

**ВНИМАНИЕ!** В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1.1. Рассчитать объемы **ПЦР-смеси BbsI** и **ПЦР-буфера-Н**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 6). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 6

Расчет объемов компонентов для одной реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь BbsI	<b>10,0*(N+1)</b>	<b>N</b> – количество амплифицируемых образцов, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	<b>5,0*(N+1)</b>	

<sup>7</sup> Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

<sup>8</sup> При необходимости допускается увеличение объема элюции до 90 мкл.



8.2.1.2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью BbsI** и **ПЦР-буфером-H**, осадить капли на вортексе.

8.2.1.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.1.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.1.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

**ВНИМАНИЕ!** Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

## 8.2.2. При использовании формы выпуска 2

8.2.2.1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью BbsI** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.

8.2.2.2. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.2.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл ПЦР-буфера-K**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

## 8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

**ВНИМАНИЕ!** При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

**ВНИМАНИЕ!** При ручном анализе программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору. При использовании программного обеспечения FRT Manager программирование амплификатора устанавливается автоматически.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции.

8.3.2. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью контрольные образцы:

а) положительный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **ПКО** внести **10 мкл ПКО BbsI**.

б) отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) отрицательный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **K-** внести **10 мкл реагента K-**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 7).

Таблица 7

**Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала**

Цикл	Температура, °C	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G, Cy5	



**Примечание** - С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

8.3.4. Перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

8.3.6. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.7. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

#### 8.4. Анализ и вычисление результатов

Анализ и обработку результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

**ВНИМАНИЕ!** При ручном анализе обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по трем каналам детекции (см. таблицу 8).

Таблица 8

#### Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	Cy5
Продукт амплификации	ДНК <i>B. burgdorferi sensu lato</i>	ДНК <i>Ixodes persulcatus</i> , ДНК <i>Ixodes ricinus</i>	ДНК ВКО

## 8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 9, 10 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 11;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: <https://www.interlabservice.ru/service/frt/>. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 9, 10 и 11 соответственно.

Таблица 9

### Интерпретация результатов для исследуемых образцов (клещи)

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналам для флуорофоров <b>FAM, R6G и Cy5 не определено или определено выше граничного</b> <sup>9</sup>	<b>Невалидный!</b> Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора <b>FAM определено не выше граничного</b> . При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналам для флуорофоров <b>R6G<sup>10</sup> и Cy5</b> не учитывается	<b>ДНК <i>B. burgdorferi sensu lato</i> обнаружена</b>
Значение Ct по каналу для флуорофора <b>FAM не определено или определено выше граничного</b> , а по каналам для флуорофоров <b>R6G и Cy5 определено не выше граничного</b>	<b>ДНК <i>B. burgdorferi sensu lato</i> не обнаружена</b>

Таблица 10

### Интерпретация результатов для исследуемых образцов (цельная кровь, плазма крови)

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора <b>R6G определено</b> , а по каналу для флуорофора <b>Cy5 не определено или определено выше граничного</b> <sup>9</sup> , при этом значение Ct по каналу для флуорофора <b>FAM</b> не учитывается	<b>Невалидный!</b> Возможна контаминация! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналам для флуорофоров <b>FAM и Cy5 не определено или определено выше граничного</b> , и по каналу для флуорофора <b>R6G не определено</b>	<b>Невалидный!</b> Сбой ВКО! Требуется повторить анализ
Значение Ct по каналу для флуорофора <b>FAM определено не выше граничного</b> . При этом кривая флуоресценции данной пробы по данному каналу пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Значение Ct по каналу для флуорофора <b>R6G не определено</b> , а по каналу для флуорофора <b>Cy5</b> не учитывается	<b>ДНК <i>B. burgdorferi sensu lato</i> обнаружена</b>
Значение Ct по каналу для флуорофора <b>FAM не определено или определено выше граничного</b> , по каналу для флуорофора <b>R6G не определено</b> , а по каналу для флуорофора <b>Cy5 определено не выше граничного</b>	<b>ДНК <i>B. burgdorferi sensu lato</i> не обнаружена</b>

<sup>9</sup> Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

<sup>10</sup> В случае, если по каналу R6G значение Ct не определено, возможно, исследуемый образец не относится к видам *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus*.

**Критерии валидности для контрольных образцов**

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
	FAM	R6G	Cy5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует	Значение Ct отсутствует	Определено значение Ct не выше граничного <sup>11</sup>
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует		
ПКО BbsI (положительный контроль ПЦР)	Определено значение Ct не выше граничного		

**8.6. Возможные ошибки и рекомендации по их решению**

8.6.1. Для отрицательного контроля экстракции (ОКО) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для положительных образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа амплификации ДНК.

8.6.3. Для положительного контроля ПЦР (ПКО BbsI) значение порогового цикла (Ct) по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или Cy5 отсутствует или определено выше граничного. Вероятна ошибка на этапе амплификации, необходимо провести повторно этап ПЦР для всех отрицательных образцов.

8.6.4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.5. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата для образцов цельной крови и плазмы крови рекомендуется повторно провести взятие, предварительную подготовку и исследование образца.

**8.7. Диагностическое значение полученного результата**

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

<sup>11</sup> Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

## 9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

### 9.1. Предел обнаружения<sup>12</sup>

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой достоверительной вероятностью (см. таблицу 12).

Значения характеристики, указанные в таблице 12, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 12

#### Предел обнаружения набора

Биоматериал	Набор для экстракции	Методика экстракции	Предел обнаружения по Probit 95%, ГЭ/мл	95%-ый достоверительный интервал, ГЭ/мл
Клещи	АмплиПрайм РИБО-преп	ручная методика экстракции	$5 \times 10^3$	$3,84 \times 10^3 - 6,96 \times 10^3$
	МагноПрайм ЮНИ	автоматическая методика экстракции	$5 \times 10^3$	$3,71 \times 10^3 - 6,08 \times 10^3$
		ручная методика экстракции с использованием магнитного штатива	$5 \times 10^3$	$4,04 \times 10^3 - 6,70 \times 10^3$
		ручная методика экстракции с использованием центрифугирования	$5 \times 10^3$	$3,71 \times 10^3 - 6,48 \times 10^3$
Цельная кровь	МагноПрайм ЮНИ	автоматическая методика экстракции	$5 \times 10^3$	$3,82 \times 10^3 - 6,43 \times 10^3$
Плазма крови	АмплиПрайм РИБО-преп	ручная методика экстракции	$5 \times 10^3$	$3,66 \times 10^3 - 6,75 \times 10^3$
	МагноПрайм ЮНИ	автоматическая методика экстракции	$5 \times 10^3$	$3,97 \times 10^3 - 6,96 \times 10^3$

### 9.2. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*» обнаруживает фрагмент ДНК *B. burgdorferi sensu lato*.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов, вирусов (см. таблицу 13) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов, вирусов в концентрации не менее  $1 \times 10^6$  копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации  $5 \times 10^6$  кл/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие ДНК *B. burgdorferi sensu lato*.

Таблица 13

#### Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
<i>Borrelia miyamotoi</i>	HSV II
<i>Ehrlichia chaffeensis</i> / <i>Ehrlichia muris</i>	HHV6
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	HBV
<i>Rickettsia conorii</i>	CMV
<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	EBV
HSV I	—

<sup>12</sup> Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК выявляемого возбудителя, при которой 95% тестов дают положительный результат).

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, вирусов и геномной ДНК человека с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

### 9.3. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость результатов с использованием набора оценивали путем тестирования модельных образцов. Модельные образцы были приготовлены путем контаминации образцов биоматериала, предусмотренного назначением набора, стандартным образцом предприятия, содержащего ДНК *B. burgdorferi sensu lato*. Были протестированы образцы в двух концентрациях, одна из которых соответствовала пределу обнаружения набора ( $5 \times 10^3$  ГЭ/мл), а вторая двукратно превышала предел обнаружения ( $1 \times 10^4$  ГЭ/мл). Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

При оценке повторяемости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения пороговых циклов (Ct), не превышал 5 %.

При оценке воспроизводимости коэффициент вариации, рассчитанный по результатам определения пороговых циклов (Ct), не превышал 10 %.

### 9.4. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*» были использованы образцы каждого вида биоматериала, предусмотренного назначением набора реагентов, в количестве, указанном в таблице 14.

В качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали наличие/отсутствие ДНК *B. burgdorferi sensu lato*, использовался набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s. l.*» (РУ № РЗН 2017/6037).

Таблица 14

**Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*»**

Исследуемые образцы		Результаты тестирования			
Тип	Количество	Образцы	Тестируемый набор «АмплиПрайм® <i>B. burgdorferi sensu lato</i> »		Набор сравнения «РеалБест ДНК <i>Borrelia burgdorferi s. l.</i> »
			Форма выпуска 1	Форма выпуска 2	
Клещи	203	Положительных	97	97	97
		Отрицательных	106	106	106
Цельная кровь	608	Положительных	70	70	70
		Отрицательных	538	538	538
Плазма крови	344	Положительных	177	177	177
		Отрицательных	167	167	167

Значения диагностической специфичности и диагностической чувствительности набора «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 15.

**Диагностические характеристики набора реагентов  
«АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*»**

Тип образцов	Диагностическая специфичность	Диагностическая чувствительность
Клещи	100 % (96,58 % – 100 %)	100 % (96,27 % – 100 %)
Цельная кровь	100 % (99,32 % – 100 %)	100 % (94,87 % – 100 %)
Плазма крови	100 % (97,82 % – 100 %)	100 % (97,94 % – 100 %)

### 9.5. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 16, в максимально возможной концентрации.

Таблица 16

**Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора  
«АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*»**

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
Клещи	гемоглобин	200 мг/мл
	альфа-циперметрин	0,1 мг/мл
Цельная кровь	гемоглобин	200 мг/мл
	билирубин	0,2 мг/мл
	ацикловир	0,3 мг/мл
	преднизолон	0,003 мг/мл
	дексаметазон	0,0006 мг/мл
	холестерин	2,5 мг/мл
	триглицериды	5 мг/мл
	альбумин	50 мг/мл
Плазма крови	гемоглобин	200 мг/мл
	билирубин	0,2 мг/мл
	ацикловир	0,3 мг/мл
	преднизолон	0,003 мг/мл
	дексаметазон	0,0006 мг/мл
	холестерин	2,5 мг/мл
	триглицериды	5 мг/мл
	альбумин	50 мг/мл

Также не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам биоматериала ДНК человека в концентрации  $1,0 \times 10^8$  копий/мл.

---

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

---

### 10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

### 10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение 3 месяцев всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

### 10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

**ВНИМАНИЕ!** Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси Vbs1 и ПЦР-буфера-N, входящих в состав формы выпуска 1, хранению не подлежит.

---

## 11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

---

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

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® *B. burgdorferi sensu lato*» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: [www.nextbio.ru](http://www.nextbio.ru).

## 12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Номер серии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде		Не допускать воздействия солнечного света
	Осторожно		