

«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
«08» декабря 2011 г.



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного учреждения
здравоохранения Российского
научно-исследовательского
противочумного института
«Микроб» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека


В.В. Кутырев
2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Yersinia pestis*

в биологическом материале методом полимеразной цепной
реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Yersinia pestis*-FL»

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	9
ФОРМАТ FRT.....	14
СОСТАВ.....	14
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	15
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»	15
А. Подготовка пробирок для амплификации	15
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	16
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	20
ПРИЛОЖЕНИЕ. Экстракция ДНК из всех видов биологического материала с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»	21
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- Внутренний контрольный образец
ОК	- Отрицательный контрольный образец экстракции
К-	- Отрицательный контроль ПЦР
К+	- Положительный контроль ПЦР
НК	- Нуклеиновые кислоты (РНК/ДНК)
ПЦР	- Полимеразная цепная реакция
ПКО	- Положительный контрольный образец
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® *Yersinia pestis-FL*» предназначен для выявления ДНК *Yersinia pestis* в биологическом материале от людей (кровь, пунктат из бубона, везикул, пустул и карбункулов, мокрота, мазки из ротоглотки, моча, фекалии, лимфатические узлы, ткани печени, селезенки, легких, надпочечников и мозга, участки патологически измененных тканей и органов); материале от животных (кровь, экскременты, лимфатические узлы, ткани паренхиматозных органов, мозга, участки патологически измененных тканей и органов); в блохах и клещах, погадках птиц и почве методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя следующие этапы: экстракцию ДНК из образцов биологического материала и проведение ПЦР-амплификации участка ДНК данного микроорганизма с гибридационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации

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

участка ДНК *Yersinia pestis* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента TaqF-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствует флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов при использовании формата FRT 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 одном формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT.

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT.

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК «РИБО-преп».

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

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

ВНИМАНИЕ! Использование формы комплектации 3 производится только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала (объем исследуемой пробы)	Комплект для экстракции РНК/ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность	Пробоподготовка материала
- блохи (30 особей, гомогенизированных в 500 мкл PBS-буфера, объем пробы 100 мкл); - клещи <i>Dermacentor reticulatus</i> (пул из 10 особей, гомогенизированных в 1 мл PBS-буфера, объем пробы 50 мкл); - кровь (200 мкл); - моча (100 мкл); - мокрота (50 мкл); - фекалии (100 мкл 10 % суспензии); - 10 % суспензия тканей печени, лимфоузлов (50 мкл)	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT	1x10 ³ копий/мл	Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом исследуемом объеме пробы

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на:

Yersinia enterocolitica (326 штаммов), *Y.pseudotuberculosis* (145 штаммов); *Shigella sonne*, *Sh.flexneri*; *Salmonella typhi*, *S.enteritidis*; *Klebsiella pneumonia*; *Esherichia coli* NCTC 9001; *Enterococcus faecalis*; *Staphylococcus aureus*, *St.saprophyticus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Proteus mirabilis*; *Enterobacter cloacae*.

При работе с ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, а также ДНК человека, ДНК клещей и блох, ДНК грызунов не выявлено ложноположительных результатов.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Взятие, хранение материала, транспортирование на исследование и работу с ним проводят в соответствии с инструктивно-методическими документами, регламентирующими выполнение исследований: СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения,

передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу с ними в биологическом кабинете в соответствии СП 1.3.1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».
- 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.
- Уничтожать образцы в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»

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.
- 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 (физиологический раствор) 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) для проведения пробоподготовки блох, клещей, тканей внутренних органов, фекалий, почвы, погадок птиц.
2. Глицерин 100 % (в случае хранения фекалий человека и животных).
 3. Реагент «МУКОЛИЗИН» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для предварительной обработки мокроты.
 4. Реагент «Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
 5. Гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия) рекомендуется использовать для гомогенизации тканей органов, клещей и блох. Металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 5 мм и 7 мм.
 6. Мертиолят натрия 0,1 % раствор. Для приготовления 0,1 % раствора мертиолята натрия 0,1 г мертиолята растворяют в 100 мл стерильного 0,9 % раствора хлорида натрия. Полученный 0,1 % раствор мертиолята хранят во флаконе из темного стекла не более 3 месяцев при температуре от 2 до 8 °С.
 7. Комплект реагентов для выделения ДНК/РНК – «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) – при работе с формой комплектации 2.
 8. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
 9. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
 10. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16000 г (например, Elmi, Латвия; Hettish, Германия).
 11. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
 12. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
 13. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
 14. Центрифуга/вортекс.
 15. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл).
 16. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.

17. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
18. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
19. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.
20. Емкость для сброса наконечников.
21. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iCycler iQ5 (Bio-Rad, США), «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
22. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора роторного типа.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г, а также СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат:

- Блохи;
- Клещи;
- Погадки птиц;
- Почва;
- Материал от людей:
 - Цельная кровь;
 - Пунктат из бубона (везикул, пустул, карбункулов) берут шприцем емкостью не менее 5 мл. Кожу на участке,

намеченном для прокола, обрабатывают 70 % спиртом, а затем смазывают 5 % раствором йода и вновь протирают 70 % спиртом. Иглу вводят с таким расчетом, чтобы ее острие достигло центральной части бубона, после чего, оттянув до отказа поршень, медленно вытягивают иглу. Так как экссудат в чумном бубоне расположен между плотными тканями, количество его, попадающее в шприц, как правило, незначительно и часто заполняет только просвет иглы. После извлечения иглы из бубона через нее набирают в шприц 0,5 мл 15М NaCl, содержимое выливают в пробирку типа «Эппендорф». В случае невозможности получить материал в бубон вводят 0,3-0,5 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. При вскрывшемся бубоне забирают материал отдельно из периферической плотной части и отделяемое свища. Обе порции исследуют отдельно;

- Мокрота;
- У больных чумой с локализацией первичных бубонов в области головы и шеи дополнительно забирают на исследование слизистое отделяемое ротовой полости и зева стерильным зондом;
- Моча;
- Материал от животных:
 - Кровь;
 - Лимфатические узлы, ткани печени, селезенки, легких, надпочечников, мозга, участки патологически измененных тканей и органов;
 - Экскременты;

Биологический материал доставляют в лабораторию в емкости со льдом в течение 1 сут.

Допускается хранение вышеперечисленного материала до проведения исследования в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С и в течение 6 мес при температуре не выше минус 16 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

1. Блохи

Допускается исследование в одной пробе до 30 блох. Блох

тщательно растереть в гомогенизаторе или стерильной ступке стерильным пестиком. Добавить 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида или PBS-буфера и тщательно перемешать. Суспензию центрифугировать при 3000 об/мин (500 г при радиусе ротора 50 мм) в течение 2 мин, затем **100 мкл верхней фазы** перенести в пробирки вместимостью 1,5 мл и использовать далее на стадии обеззараживания.

2. Клещи

При исследовании иксодовых клещей допускается исследование в одной пробе имаго: до 3 напивавшихся особей, до десяти голодных особей; нимф – до 10 напивавшихся, до 30 голодных; личинок – до 30 напивавшихся особей. Напивавшихся имаго необходимо перед гомогенизацией в ступке предварительно проткнуть иглой для выхода крови. При использовании гомогенизатора закрытого типа в этой процедуре нет необходимости. Клещей тщательно растереть в гомогенизаторе или стерильной ступке стерильным пестиком. Добавить 1,0 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида или PBS-буфера и тщательно перемешать. Суспензию центрифугировать при 3000 об/мин (500 г при радиусе ротора 50 мм) в течение 2 мин, затем **50 мкл верхней фазы** перенести в пробирки вместимостью 1,5 мл для экстракции ДНК.

3. Экскременты человека и животных

Приготовление 10-20 % суспензии:

- В пробирки на 5 мл с плотно закрывающейся (завинчивающейся) крышкой внести по 2 мл физиологического раствора или PBS-буфера.
- В каждую пробирку отдельными наконечниками с фильтрами (или одноразовыми лопатками) внести по 0,5-1,0 г (около 0,5-1,0 мл) экскрементов и тщательно перемешать содержимое до образования гомогенной суспензии. При необходимости хранения к суспензии добавляют глицерин до концентрации 20 %, перемешивают и хранят при температуре не выше минус 16 °С.
- Приготовление бактериальной фракции экскрементов:
Из пробирок с суспензией экскрементов перенести 1 мл суспензии в пробирки на 1,5 мл с плотно закрывающейся крышкой и центрифугировать на микроцентрифуге 5 мин при 8000 г. Для экстракции ДНК **использовать 100 мкл светлой**

фракции, находящейся на границе жидкой прозрачной и твердой фракций экскрементов.

4. Погадки птиц

Фрагменты костного мозга из костных остатков погадок тщательно растереть в гомогенизаторах или с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавить объем (не менее 500 мкл) стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида или PBS-буфера до получения 10 % суспензии и тщательно перемешать. Суспензию отстаивать при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу перенести в пробирки вместимостью 1,5 мл. ДНК выделяют из **100 мкл суспензии**.

5. Почва

В пробирки объемом 5 мл с плотно закрывающейся (завинчивающейся) крышкой отдельным шпателем (или одноразовыми лопатками) внести по 0,4-1,0 г (около 1,0 мл) земли, залить 3 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, тщательно перемешать и отстаивать 5 мин. Из пробирок с отстоявшейся землей перенести 1 мл раствора в пробирки объемом 1,5 мл с плотно закрывающейся крышкой и осадить грубодисперсную фракцию центрифугированием на микроцентрифуге в течение 2-3 мин при 300 g (2300 об/мин при радиусе ротора 50 мм). Для экстракции ДНК использовать осветленную надосадочную жидкость в объеме **100 мкл**.

6. Кровь

Взятие цельной периферической крови у людей проводится утром натощак в пробирку с 6 % раствором ЭДТА в соотношении 1:20. Закрытую пробирку несколько раз переворачивают. В пробирку типа «Эппендорф» вносят 1,5 мл цельной крови, взятой с ЭДТА, и центрифугируют при 800 об/мин (380 g при диаметре ротора 50 мм) в течение 10 мин; затем верхний слой плазмы (500-600 мкл) с лейкоцитами переносят во вторую пробирку типа «Эппендорф» и центрифугируют при 8000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (за исключением 200 мкл жидкости над осадком клеток) переносят в контейнер с дезраствором, а **осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости** используют для экстракции ДНК.

При исследовании крови животных в том случае, если исследованию подвергаются сгустки крови из сердца и крупных сосудов, пробоподготовка проводится аналогично работе с

органами.

7. Мокрота

Предобработка материала выполняется по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». **50 мкл пробы** используют для экстракции ДНК.

8. Мазки из ротоглотки

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков (либо стерильного физиологического раствора или PBS-буфера). Конец зонда отламывают или отрезают стерильными ножницами, с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают. Перед началом работы зонд удаляют из пробирки в дезраствор и используют для экстракции ДНК **100 мкл пробы**.

9. Моча

Для исследования моча собирается в чистую посуду. Если нет возможности исследовать материал в течение 1 суток после забора, моча переносится в центрифужную пробирку на 20 мл или пробирку типа «Эппендорф», затем в нее вносят глицерин (10 % от объема пробы), перемешивают для равномерного распределения глицерина и замораживают при температуре минус 20 °С для хранения в течение 1 недели или при минус 70 °С для хранения в течение более длительного времени.

При наличии центрифуги с охлаждением до 4 °С для пробирок объемом 20 мл и ускорением 8000 g используется следующий алгоритм пробоподготовки:

- Пробу центрифугируют при 8000-9000 g в течение 10 минут, затем надосадочную жидкость (за исключением 1 мл жидкости над осадком клеток) переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, а осадок и 1 мл надосадочной жидкости над ним – в пробирку типа «Эппендорф». После этого снова концентрируют пробу при 8000 g в течение 10 минут. 900 мкл надосадочной жидкости переносят в емкость с дезинфицирующим раствором, а **осадок и 100 мкл надосадочной жидкости** используют для экстракции ДНК. В случае наличия большого количества солей для экстракции

ДНК в отдельную пробирку типа «Эппендорф» переносят **100 мкл надосадочной жидкости.**

- При отсутствии центрифуги для пробирок объемом 20 мл и ускорением 8000 g, проводят концентрирование бактерий только из 1 мл мочи как описано выше. Экстракцию ДНК также проводят из **осадка и 100 мкл надосадочной жидкости.**

10. Органы

Кусочки размером не менее 0,5 см³ и лимфоузлы (целиком) тщательно растереть в гомогенизаторах или с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавить объем (не менее 500 мкл) стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида или PBS-буфера и тщательно перемешать. Суспензию отстаивать при комнатной температуре в течение 2-3 мин, затем верхнюю фазу перенести в пробирки вместимостью 1,5 мл. ДНК выделяют **из 50 мкл суспензии.**

Материал после пробоподготовки до стадии обеззараживания и экстракции ДНК возможно хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение 1 месяца или длительно при минус 70 °С.

**ФОРМАТ FRT
СОСТАВ**

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 – 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 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 ДНК из 50 проб, включая контроли.

Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации ДНК участка генома *Yersinia pestis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Yersinia pestis</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Yersinia pestis</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

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

К комплекту реагентов «ПЦР-комплект» прилагается следующий реагент:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

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

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с гибридационно-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 по применению набора реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплект реагентов «РИБО-преп» (порядок работы см. в Приложении 1). Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87).

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

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

1. Приготовить реакционную смесь на необходимое количество реакций. При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается амплификацией как минимум трех контрольных реакций: отрицательного контроля экстракции (OK), положительного и отрицательного контролей ПЦР (К+ и К-). Кроме того, необходимо брать реагенты с **запасом** и рассчитывать на одну реакцию больше.
2. В отдельной пробирке необходимо смешать **ПЦР-смесь-1-**

FRT *Yersinia pestis*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF) из расчета на каждую реакцию:

- **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *Yersinia pestis*;**
- **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT;**
- **0,5 мкл полимеразы (TaqF).**

3. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК.
4. Раскапать в пробирки по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь не хранить!

5. В пробирки с реакционной смесью добавить, используя наконечник с фильтром, **10 мкл** исследуемой ДНК, полученной в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.

6. Поставить контрольные реакции:

- а) **отрицательный контроль ПЦР (К-) –** внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера.**
- б) **положительный контроль ПЦР (К+) –** внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Yersinia pestis* / STI.**
- в) **отрицательный контроль экстракции (ОК) –** внести в пробирку **10 мкл** образца, выделенного из пробы ОК.

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы и контролей!

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 (см. табл. 1).

Таблица 1

Цикл	Приборы роторного ³ и планшетного ⁴ типа		
	Температура, °С	Время	Число повторов циклов
1	95	15 мин	1
2	95	5 с	5
	60	20 с	
	72	15 с	
3	95	5 с	40
	60	30 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	15 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM и JOE.

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

ВНИМАНИЕ! Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.

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 прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО STI-87;
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Yersinia pestis*.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с

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

⁴ например, iQ5, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК *Yersinia pestis* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее граничное значение, указанное во вкладыше. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Yersinia pestis* **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение, а по каналу JOE не определено значение порогового цикла *Ct*.
- Результат анализа **невалидный**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* по каналу JOE, и по каналу FAM значение *Ct* также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции.

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также «Методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 2).

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>	
		по каналу для флуорофора JOE	по каналу для флуорофора FAM
OK	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
K-	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
K+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Yersinia pestis*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (OK) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Yersinia pestis*.
3. Если для отрицательного контроля ПЦР (K-) по каналам FAM и/или JOE определено значение порогового цикла *Ct*, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Yersinia pestis*, с постановкой K- не менее чем в трех повторах.

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 при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Yersinia pestis*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Yersinia pestis* хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Yersinia pestis*-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
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н.Родионова

Директор ФБУН ГНЦ прикладной
микробиологии и биотехнологии
Роспотребнадзора



И.А.Дятлов

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

ПРИЛОЖЕНИЕ. Экстракция ДНК из всех видов биологического материала с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»

ВНИМАНИЕ! Перед проведением экстракции ДНК необходимо произвести обеззараживание исследуемого материала согласно **МУ 3.1.3.2355-08 «Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации»!**

Порядок проведения обеззараживания биологического материала:

- К подготовленным для экстракции ДНК пробам, взятым в рекомендованном объеме, добавляют мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01 % раствор) и прогревают при 56 °С в течение 30 мин. Далее в пробу добавляют 300 мкл раствора для лизиса на основе 6 М гуанидинтиоцианата и инкубируют в течение 15 мин. при температуре 65 °С.
- Дальнейшие исследования проб с обеззараженным материалом проводить по порядку процедур, описанных ниже.

Экстракция ДНК из всех видов биологического материала с применением комплекта реагентов «РИБО-преп»

1. В обеззараженные и подготовленные для экстракции пробы в каждую пробирку внести по **10 мкл ВКО STI-87**.
2. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **10 мкл ВКО STI-87** и **300 мкл раствора для лизиса**.
3. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Пробы необходимо центрифугировать в течение **5 с при 5000 об/мин** для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.
4. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
5. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13000 об/мин**.
6. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

наконечник 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 **13000 об/мин в течение 2 мин** на микроцентрифуге.
9. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
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 **13000 об/мин в течение 2 мин** на микроцентрифуге.
12. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник 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. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
15. Процентрифугировать пробирки при **13000 об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенная ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °С и до года при температуре не выше минус 16 °С.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации



Код партии



Максимальное число тестов



Изделие для in vitro диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель