

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 26.09.2012 № 1619-Пр/12

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
«28» сентября 2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-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.....	7
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	9
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	10
СОСТАВ	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	14
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	14
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	14
А. Подготовка пробирок для амплификации	14
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	15
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	16
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	19
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО- преп»	20
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	22

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
В-	- отрицательный контроль экстракции
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
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® *Coxiella burnetii*-FL»** предназначен для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в клещах, биологическом материале от людей (кровь, мокрота, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал) и материале от животных (кровь, секционный материал, плацента и абортный материал) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление *Coxiella burnetii* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов биологического материала, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT). 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 проводится реакция амплификации участка ДНК *Coxiella burnetii* при помощи специфичных к этому

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

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 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F.

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

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК *Coxiella burnetii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции РНК/ДНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК *Coxiella burnetii* 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! Форма комплектации 3 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид биологического материала (объем исследуемой пробы)	Комплект для выделения РНК/ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность ² , ГЭ/мл	Пробоподготовка материала
-клещи рода <i>Dermacentor</i> (50 мкл клещевой суспензии); -кровь (лейкоцитарная фракция крови, 200 мкл); -10 % суспензия тканей селезенки и печени (50 мкл)	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F	5x10 ³	Данная чувствительность достигается при соблюдении нижеизложенных правил пробоподготовки биоматериала и рекомендуемом исследуемом объеме пробы

Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность изучена на бактериях *Rickettsia conorii* ssp. *Caspia*, *Ehrlichia muris* и *Francisella tularensis*, а также вирусах – вирусе Западного Нила, вирусе Крымской-Конго геморрагической лихорадки и *Herpesvirus*.

При работе с РНК/ДНК вышеперечисленных микроорганизмов, а также ДНК человека, ДНК клещей и 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. 1285-3 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», МУ 1.3.2569-09 «Организация

² Количество геномных эквивалентов микроорганизма (ГЭ) в 1 мл образца исследуемого материала.

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 необходимо выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как потенциально инфекционные и работать 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. 1285-3 «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. 1285-3 «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.
- 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 (физиологический раствор) или фосфатный буферный раствор (PBS) (натрия хлорид, 137 мМ; калия хлорид, 2,7 мМ; натрия монофосфат, 10 мМ; калия дифосфат, 2 мМ; рН=7,5±0,2) для проведения пробоподготовки клещей, тканей внутренних органов, секционного материала.
2. 96 % раствор этанола для проведения пробоподготовки клещей, обработанных маслом.
3. Глицерин для проведения пробоподготовки клещей.
4. Гомогенизатор TissueLyser LT (Qiagen, Германия) и металлические шарики из нержавеющей стали диаметром 5 мм и 7 мм рекомендуются для гомогенизации тканей органов и клещей.
5. Стерильные фарфоровая ступка и пестик для пробоподготовки внутренних органов и секционного материала.
6. Реагент «МУКОЛИЗИН» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для предварительной обработки мокроты.

ЗОНА 1. Экстракция ДНК из биологического материала.

7. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) – при работе с формой комплектации 1.
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.
10. Автоматические дозаторы переменного объема (от 20 до 200 мкл, от 100 до 1000 мкл).
11. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
12. Штатив для пробирок объемом 1,5 мл.
13. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и 1000 мкл.
14. Штативы для наконечников.

15. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс г.
16. Вортекс.
17. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости.
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.

ЗОНА 2. Проведение ПЦР и гибридационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации

21. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
22. Центрифуга/вортекс.
23. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл, от 20 до 200 мкл).
24. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
25. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
26. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
27. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.
28. Емкость для сброса наконечников.
29. 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).
30. 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; Qiagen, Германия) – 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, а также СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат:

- Иксодовые клещи: *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Ixodes*.

Материал от людей:

- Цельная периферическая кровь, мокрота, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал (ткани мозга, сердца, легких, селезенка).

Материал от животных:

- кровь, плацента, абортивный материал, секционный материал (селезенка).

Кровь, мокроту, промывные воды бронхов, ликвор, секционный материал доставляют в лабораторию в емкости со льдом в течение 1 сут.

При поступлении в лабораторию проводят пробоподготовку крови, ликвора, промывных вод бронхов с получением бактериального осадка, после чего либо сразу приступают к экстракции нуклеиновых кислот либо замораживают пробу для длительного хранения. Клещей хранят или живыми (до 1 мес), или 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре не выше минус 68 °С. Секционный и абортивный материал, а также плаценту хранят 1 нед при температуре не выше минус 16 °С, далее – при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

1. Клещи

Клещей предпочтительнее исследовать индивидуально. В том случае, если клещи были обработаны маслом, их следует поместить в пробирки типа «Эппендорф», добавить 500 мкл 96 % этанола и встряхнуть на вортексе. Пробирку центрифугировать в течение 3-5 с на микроцентрифуге типа вортекс для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки, после чего жидкость аккуратно отобрать с помощью вакуумного отсасывателя. Затем в пробирку с клещами добавить 500 мкл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида или PBS-буфера, встряхнуть на вортексе, центрифугировать в течение 3-5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки, после чего жидкость аккуратно отобрать с помощью вакуумного отсасывателя. Для приготовления суспензий клещей использовать стерильную фарфоровую чашку и стерильный пестик. При наличии автоматического гомогенизатора TissueLyser LT применять следующие параметры гомогенизации: 1) для клещей родов *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* и *Dermacentor* диаметр шариков 7 мм, частота 50 Гц/с, время гомогенизации 10–12 мин, объем буфера 700 мкл (ненапитавшийся клещ) или 1000-1500 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей); 2) для клещей рода *Ixodes* диаметр шариков 5 мм, частота 50 Гц/с, время гомогенизации 5–10 мин, объем буфера 300 мкл (ненапитавшийся клещ) или 700-1000 мкл (напитавшийся клещ и пулы клещей).

В случае гомогенизации напитавшихся клещей в ступке их предварительно следует проколоть стерильной одноразовой иглой в нескольких местах для выхода крови. Клещей растереть в 700 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща родов *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*) или в 300 мкл (если проба состоит из одного ненапитавшегося клеща рода *Ixodes*), в 1-1,5 мл (если гомогенизируют пул клещей или напитавшегося клеща родов *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*), или в 1000 мкл (если гомогенизируют пул клещей или напитавшегося клеща рода *Ixodes*) 0,15 М раствора хлорида натрия, смешивая

раствор с клещами небольшими объемами, затем полученную суспензию центрифугировать при 5 тыс об/мин в течение 2 мин и отобрать 50 мкл надосадочной жидкости для экстракции ДНК. Оставшийся объем суспензии без осадка перенести в новую пробирку типа «Эппендорф» и внести глицерин (10 % по объему), пробу перемешать и заморозить при температуре не выше минус 16 °С для последующего исследования.

2. 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» внести 1,5 мл цельной крови, взятой с ЭДТА, и центрифугировать при 800 об/мин (380 g при диаметре ротора 50 мм) в течение 10 мин; затем верхний слой плазмы (500-600 мкл) с лейкоцитами перенести во вторую пробирку типа «Эппендорф» и центрифугировать при 9 000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (за исключением 200 мкл жидкости над осадком клеток) перенести в контейнер с дезинфицирующим раствором, а **осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости** использовать для экстракции ДНК.

3. Внутренние органы, плацента и abortивный материал от животных, секционный материал, полученный от человека

Кусочки объемом не менее 0,5 см³ тщательно растереть в гомогенизаторах или с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, добавить стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида или PBS-буфер не менее 500 мкл и тщательно перемешать. При подготовке плаценты гомогенизаторы использовать не рекомендуется. Готовую 10 % 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**.

4. Мокрота

Предобработку материала выполнять по инструкции к реагенту «МУКОЛИЗИН». Для экстракции ДНК использовать **50 мкл пробы**.

5. Ликвор и промывные воды бронхов

1,0 мл клинического образца перенести в пробирку типа

«Эппендорф» и центрифугировать при 9 000 g в течение 5 мин. Надосадочную жидкость (за исключением 200 мкл жидкости над осадком клеток) перенести в контейнер с дезинфицирующим раствором, а **осадок клеток и 200 мкл надосадочной жидкости** использовать для экстракции ДНК.

Материал после пробоподготовки до экстракции ДНК можно хранить при температуре не выше минус 20 °С в течение 1 мес или длительно при температуре не выше минус 68 °С.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

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

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

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 2.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Coxiella burnetii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Coxiella burnetii</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>Coxiella burnetii</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагается контрольный образец этапа экстракции:

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

³ 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 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 по применению набора реагентов для выявления ДНК *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87).

При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» порядок работы см. в **приложении 1** «Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп».

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 образцов: отрицательного контроля экстракции (В–), положительного и отрицательного контролей ПЦР (К+ и К–). Кроме того, необходимо брать реагенты с **запасом**: рассчитывать на одну реакцию больше.

2. В отдельной пробирке необходимо смешать **ПЦР-смесь-1-FRT *Coxiella burnetii*, ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT, полимеразу (TaqF)** из расчета на каждую реакцию:
 - **10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *Coxiella burnetii*;**
 - **5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FEP/FRT;**
 - **0,5 мкл полимеразы (TaqF).**
3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов.
4. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.

ВНИМАНИЕ! Приготовленную смесь не хранить!

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных 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 *Coxiella burnetii* / STI.**
 - в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из (В–).

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси с пробами 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

Таблица 1

Цикл	Приборы роторного типа ⁴			Приборы планшетного типа ⁵		
	Температура	Время	Кол-во циклов	Температура	Время	Кол-во циклов
1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1
2	95 °С	5 с	5	95 °С	5 с	5
	60 °С	20 с		60 °С	25 с	
	72 °С	15 с		72 °С	15 с	
3	95 °С	5 с	40	95 °С	5 с	40
	56 °С	20 с детекция флуоресц. Сигнала		56 °С	25 с детекция флуоресц. Сигнала	
	72 °С	15 с		72 °С	15 с	

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

- Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора. **Лунка №1 обязательно должна быть заполнена какой-либо исследуемой пробиркой.**
- Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора 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 фрагмента ДНК *Coxiella burnetii*.

⁴ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁵ Например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

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 ДНК значения порогового цикла Ct в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

- ДНК *Coxiella burnetii* **обнаружена**, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла Ct , не превышающее указанное (граничное) значение. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- ДНК *Coxiella burnetii* **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 *Coxiella burnetii* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Coxiella burnetii*-FL».

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).

Таблица 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
В–	Экстракция ДНК	Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного
К–	ПЦР	Значение отсутствует	Значение отсутствует
К+	ПЦР	Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного

ВНИМАНИЕ!

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-преп» и «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Coxiella burnetii*, полимеразу (TaqF) и ОТ-ПЦР-смесь-2-FEP/FRT (из комплекта реагентов «ПЦР-комплект») хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Coxiella burnetii* хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «**АмплиСенс®** *Coxiella burnetii*-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)⁶.

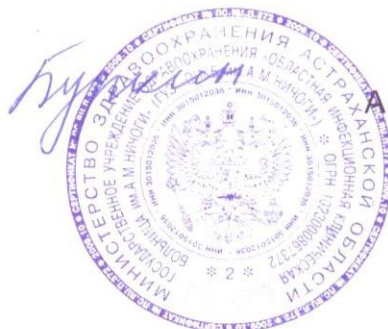
Заведующий НПЛ ОМДиЭ

Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач Областной инфекционной
клинической больницы им.А.М.Ничоги

г.Астрахань



А.В.Буркин

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп»

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

Порядок работы.

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 случае экстракции ДНК из суспензий клещей и тканей, мокроты** отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку, предназначенную для экстракции исследуемых проб, по **10 мкл ВКО STI-87** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
2. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87** внести по **50 мкл** суспензий клещей, суспензий тканей и обработанной муколизином мокроты.
3. **В случае экстракции ДНК из осадков клеток крови, ликвора, промывных вод бронхов** в пробирки с пробоподготовленным материалом внести по **300 мкл раствора для лизиса**. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и процентрифугировать на вортексе для удаления капель с крышки пробирки. В пробирки с исследуемыми пробами внести по **10 мкл ВКО STI-87**. Промаркировать пробирки.
4. В пробирку отрицательного контроля (В–) экстракции внести **только 10 мкл ВКО STI-87** и **300 мкл раствора для лизиса**.
5. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 10 000 g**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

8. 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.
9. Центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Центрифугировать пробирки при **10 000 g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР. Очищенная ДНК может храниться до 24 ч при температуре от 2 до 8 °C и до года при температуре не выше минус 16 °C.

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