УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 27.05.2010 г. №
4785-Пр/10

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.И.Покровский
«9» 03 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации ДНК
вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia enterocolitica*
и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*
в объектах окружающей среды и клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Yersinia enterocolitica* / *pseudotuberculosis*-FL»

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

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ 2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК 8
ВАРИАНТ FEP 9
СОСТАВ 9
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 9
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 10
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» 10
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» 13
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 14
ВАРИАНТ FRT 18
СОСТАВ 18
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ 18
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 18
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 19
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 21
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 25

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль этапа экстракции ДНК/РНК
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
кДНК	- комплементарная ДНК
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- детекция по «конечной точке»
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *Yersinia enterocolitica* / *pseudotuberculosis*-FL»** предназначен для выявления и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia enterocolitica* (оценка вирулентности проводится по генам энтеротоксина (Yst), локуса прикрепления и инвазии (attachment invasion locus - ail) и плазмидному гену адгезина (plasmid pYV adhesin - yadA)) и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора («ДНК-сорб-В», «РИБО-сорб» или «РИБО-преп»).

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia enterocolitica* и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию (выделение) ДНК из образцов клинического материала, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридизационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (вариант FRT), либо после ее завершения (вариант FEP). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в

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

присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Пробы ДНК используются для амплификации участка ДНК перечисленных выше возбудителей при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, 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. Детекция флуоресцентного сигнала при использовании варианта FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании варианта FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 варианте

Вариант FEP/FRT

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения реакции амплификации и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia enterocolitica* и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке» и в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Патоген	Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствитель-ность
Y. enterocolitica	фекалии	**«РИБО-преп»**	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10^3 ГЭ/мл

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

Y. pseudotuberculosis	фекалии	**«РИБО-преп»**	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10^3 ГЭ/мл

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов:

Штаммы из коллекции ФГУ ВГНКИ: *Salmonella enteritidis* S-6, *Salmonella choleraesuis* 370, *Salmonella typhimurium* 371, *Salmonella dublin* 373, *Salmonella typhi* C1, *Salmonella abortusovis* 372, *Salmonella gallinarum-pullorum*, *Shigella flexneri* 851b, *Campylobacter fetus subsp. fetus* 25936, *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* 43435, *Klebsiella K* 65 SW4, *Listeria monocytogenes* УСХЧ 19, *Listeria monocytogenes* УСХЧ 52, *Proteus vulgaris* 115/98, *Pseudomonas aeruginosa* ДН с1, *Staphylococcus aureus* 653, *Staphylococcus aureus* 29112, *Morganella morganii* 619 с 01, *Enterococcus faecalis* 356.

Штаммы *Yersinia enterocolitica* (115 штаммов) и *Yersinia pseudotuberculosis* (84 штамма) из собрания ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Вакцинные штаммы *Yersinia pestis*.

При проведении тестирования данных панелей, а также образцов ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III – IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в

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

соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

ВНИМАНИЕ! При утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР после амплификации, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации 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.
- Лист безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступен по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения ДНК – «ДНК-сорб-В» (ТУ 9398-003-01897593-2009), РНК/ДНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
4. Центрифуга/вортекс.
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в

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

штативах.

7. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
10. Емкость для сброса наконечников.

<u>При детекции по «конечной точке»:</u>

11. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cycler (Corbett Research, Австралия), MaxyGene (Axygen, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) или аналогичные).
12. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (с плоской крышкой, нестрипованные):
    а) объемом 0,2 мл (например, Axygen, США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл (Gradient Palm Cycler, GeneAmp PCR System 2700, MaxyGene и др.);
    б) объемом 0,5 мл (например, Axygen, США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 мл («Терцик» и др.).

<u>При детекции в режиме «реального времени»:</u>

14. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия), iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
15. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
    а) на 0,2 мл (с плоской крышкой, нестрипованные; например, Axygen, США) для постановки в ротор на 36 пробирок – к приборам для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, Rotor-Gene).
    б) на 0,2 мл (с куполообразной крышкой; например, Axygen, США) – к приборам для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, iQ5, Mx3000P).

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

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.

Материалом для исследования служат образцы фекалий и концентраты образцов воды, подготовленные в соответствии с МУК 4.2.2029-05 «Методические указания по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов».

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Концентраты образцов воды не требуют специальной подготовки для экстракции ДНК. Подготовка образцов фекалий проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

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

ВАРИАНТ FEP

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для проведения реакции амплификации и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia enterocolitica* и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Y.enterocolitica* / *Y.pseudotuberculosis*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Yersinia enterocolitica* type	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПКО ДНК *Y*.enterocolitica / *Y.pseudotuberculosis* / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	8,0	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения ДНК:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация ДНК/кДНК.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию ДНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для экстракции ДНК из клинического материала («ДНК-сорб-В», «РИБО-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют ОКО.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы (TaqF-ДНК-полимераза), которая активируется при прогреве реакционной смеси при температуре 95 °С в течение 15 мин.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно расчетной таблице (см. табл. 1). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого или контрольного образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительного контроля (К+), отрицательного контроля (К-) и двух пробирок **«Фон»** для каждого типа смеси). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

1. До начала работы все реагенты набора разморозить, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

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

2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов ДНК реагентов и пробирок **«Фон»**. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. Для приготовления реакционных смесей и смесей для пробирок **«Фон»** необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать одну из **ПЦР-смесей-1 (ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Y.enterocolitica / Y.pseudotuberculosis*** или **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Yersinia enterocolitica* type)** и **ПЦР-смесь-2-FRT** согласно табл. 1. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Приготовить 4 пробирки **«Фон»** (по две для каждого типа реакционной смеси). Для этого внести по **15 мкл** приготовленных смесей (без полимеразы (TaqF)) в две пробирки **«Фон»**, добавить по **10 мкл ДНК-буфера**, перемешать пипетированием. Сверху раскапать по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно **25 мкл**).

Таблица 1

Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией по «конечной точке»

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	**10.00**	**5.00**	**0.50**
Число реакций[1]	**ПЦР-смесь-1-FEP/FRT**	**ПЦР-смесь-2-FRT**	**Полимераза (TaqF)**
6	**60**	**30**	**2.0**
8	**80**	**40**	**3.0**
10	**100**	**50**	**4.0**
12	**120**	**60**	**5.0**
14	**140**	**70**	**6.0**
16	**160**	**80**	**7.0**
18	**180**	**90**	**8.0**
20	**200**	**100**	**9.0**
22	**220**	**110**	**10.0**
24	**240**	**120**	**11.0**
26	**260**	**130**	**12.0**
28	**280**	**140**	**13.0**
30	**300**	**150**	**14.0**
32	**320**	**160**	**15.0**
34	**340**	**170**	**16.0**

5. В оставшиеся части реакционных смесей добавить **полимеразу (TaqF)** (во все смеси) в количестве, указанном в

[1] Число клинических образцов, контроли этапа выделения ДНК (N), контроли этапа ПЦР и пробирки «Фон» с запасом на один образец (N+4+1).

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

табл. 1. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемого в реакционную смесь фермента полимеразы (TaqF), указанное в табл. 2, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для двух пробирок «Фон» (с вычетом двух пробирок «Фон»).

6. Внести в оставшиеся пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей. Сверху раскапать по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно **25 мкл**).
7. Используя наконечники с аэрозольными барьерами, в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения нуклеиновых кислот. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении ДНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» или «РИБО-сорб», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

8. Поставить контрольные реакции амплификации:
   а) отрицательный контроль (К-) – внести в пробирки с реакционной смесью **10 мкл ДНК-буфера**;
   б) положительный контроль (К+) – внести в пробирки по **10 мкл ПКО ДНК *Y.enterocolitica* / *Y.pseudotuberculosis* / STI**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы и контролей. Запуск реакции на приборе должен произойти не позже, чем через 10-15 минут с момента внесения проб в реакционную смесь.

9. Запустить на амплификаторе программу амплификации (см. табл. 2 и методические рекомендации к инструкции).

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

Таблица 2

Программа амплификации ДНК

	Амплификаторы с активным регулированием температуры (по раствору в пробирке):						Амплификаторы с матричным регулированием температуры: **Uno-2 (Biometra), MiniCycler, PTC-100 (MJ Research)**		
	GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология»)			**GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cycler (Corbett Research)**					
цикл	темпера-тура	время	кол-во циклов	темпера-тура	время	кол-во циклов	темпера-тура	время	кол-во циклов
0	**95 °C**	Пауза		**95 °C**	пауза		**95 °C**	пауза	
1	**95 °C**	15 мин	1	**95 °C**	15 мин	1	**95 °C**	15 мин	1
2	**95 °C**	10 с	42	**95 °C**	10 с	42	**95 °C**	1 мин	42
	60 °C	10 с		**60 °C**	25 с		**60 °C**	1 мин	
	72 °C	10 с		**72 °C**	25 с		**72 °C**	1 мин	
3	**72 °C**	1 мин	1	**72 °C**	1 мин	1	**72 °C**	1 мин	1
4	**10 °C**	Хранение		**10 °C**	хранение		**10 °C**	хранение	

10. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по трем каналам.

Таблица 3

Схема соответствия тестируемых патогенов и каналов флуоресцентной детекции

Канал детекции	**ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Y.enterocolitica / Y.pseudotuberculosis***	**ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Yersinia enterocolitica* type**
FAM	ДНК ВКО-FL	ДНК *Y.enterocolitica* *(Ail положительные)*
HEX	ДНК *Y.pseudotuberculosis* *(все штаммы)*	ДНК *Y.enterocolitica* *(Yst положительные)*
ROX	ДНК *Y.enterocolitica* *(все штаммы)*	ДНК *Y.enterocolitica* *(yadA положительные)*

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш, прилагаемый к ПЦР-комплекту, а также методические рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® *Yersinia enterocolitica /*

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

pseudotuberculosis-FL», разработанные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб ДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора (см. табл. 4).

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

Таблица 4

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Результат по уровню флуоресценции			Результат
	Канал FAM	**Канал HEX**	**Канал ROX**	
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Y.enterocolitica / Y.pseudotuberculosis*	**Выше** порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена ДНК *Y.enterocolitica* и *Y.pseudotuberculosis*
	Выше или Ниже порогового значения	**Выше** порогового значения положительного результата	Выше или Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлена ДНК *Y.pseudotuberculosis*
	Выше или Ниже порогового значения	Выше или Ниже порогового значения отрицательного результата	**Выше** порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК *Y.enterocolitica*
	Ниже порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Результат **невалидный** - проба требует повторной экстракции и амплификации
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Yersinia enterocolitica* type	**Выше** порогового значения положительного результата	Выше или Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше или Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлен фактор вирулентности *Y.enterocolitica - локус прикрепления и инвазии - Ail*
	Выше или Ниже порогового значения отрицательного результата	**Выше** порогового значения положительного результата	Выше или Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлен фактор вирулентности *Y.enterocolitica – энтеротоксин - Yst*
	Выше или Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше или Ниже порогового значения отрицательного результата	**Выше** порогового значения положительного результата	В пробе выявлен фактор вирулентности *Y.enterocolitica - плазмидный ген адгезина - yadA*
	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлены факторы вирулентности *Y.enterocolitica*

Если значение уровня флуоресценции для пробы находится между пороговыми значениями положительного и отрицательного результата, он расценивается как

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

сомнительный и требует повторения ПЦР-исследования соответствующего исследуемого образца.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК в соответствии с табл. 5.

Таблица 5

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Конт-роль	Контроли-руемый этап	Канал FAM	Канал HEX	Канал ROX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Y.enterocolitica / Y.pseudotuber-culosis*	ОК	Экстракция ДНК	Выше порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата
	К-	ПЦР	Ниже порогового значения	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата
	К+	ПЦР	Выше порогового значения	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT Yersinia enterocolitica type	ОК	Экстракция ДНК	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата
	К-	ПЦР	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата
	К+	ПЦР	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата	Выше порогового значения положительного результата

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналам HEX, FAM или ROX ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить

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

амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых сигнал по каналам HEX, FAM или ROX был ниже порогового значения положительного результата на соответствующем типе ПЦР-смеси-1.

2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) (кроме **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Y.enterocolitica* / *Y.pseudotuberculosis*** по каналу FAM) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) (по всем каналам) сигнал выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК соответствующих патогенов, начиная с этапа выделения (экстракции) ДНК.

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

ВАРИАНТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для проведения реакции амплификации и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia enterocolitica* и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* – **включает:**

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Y.*enterocolitica / *Y.pseudotuberculosis*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Yersinia enterocolitica* type	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПКО ДНК *Y.enterocolitica* / *Y.pseudotuberculosis* / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	8,0	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения и для экстракции ДНК:

Реактив	*Описание*	*Объем, мл*	*Кол-во*
ВКО-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) ДНК из исследуемых образцов.
- Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию ДНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для экстракции ДНК из

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

клинического материала («ДНК-сорб-В», «РИБО-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL).

В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют ОКО.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением анализа. Смешивать реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, необходимо согласно **расчетной таблице** (см. таблицу 6). Следует учитывать, что **для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительного контроля (К+) и отрицательного контроля (К-) для каждого типа смеси).** Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

1. До начала работы все реагенты набора разморозить, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов ДНК. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. Для приготовления реакционных смесей необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать одну из **ПЦР-смесей-1 (ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Y.enterocolitica* / *Y.pseudotuberculosis*** или **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Yersinia***

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

***enterocolitica* type)**, **ПЦР-смесь-2-FRT** и **полимеразу (TaqF)** в количестве, указанном в таблице 6. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

4. Внести в отобранные пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей.

Таблица 6

Схема приготовления реакционных смесей для ПЦР с детекцией в режиме «реального времени»

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	**10.00**	**5.00**	**0.50**
Число реакций[2]	**ПЦР-смесь-1-FEP/FRT**	**ПЦР-смесь-2-FRT**	**Полимераза (TaqF)**
4	**40**	**20**	**2.0**
6	**60**	**30**	**3.0**
8	**80**	**40**	**4.0**
10	**100**	**50**	**5.0**
12	**120**	**60**	**6.0**
14	**140**	**70**	**7.0**
16	**160**	**80**	**8.0**
18	**180**	**90**	**9.0**
20	**200**	**100**	**10.0**
22	**220**	**110**	**11.0**
24	**240**	**120**	**12.0**
26	**260**	**130**	**13.0**
28	**280**	**140**	**14.0**
30	**300**	**150**	**15.0**
32	**320**	**160**	**16.0**

5. Используя наконечники с аэрозольными барьерами, в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения нуклеиновых кислот. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении ДНК-проб, выделенных с помощью комплектов реагентов «ДНК-сорб-В» и «РИБО-сорб», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.

6. Поставить контрольные реакции амплификации:
   - **а) отрицательный контроль (К-)** – внести в пробирки с реакционной смесью **10 мкл ДНК-буфера**;
   - **б) положительный контроль (К+)** – внести в пробирки **10 мкл ПКО ДНК *Y.*enterocolitica / *Y.pseudotuberculosis* / STI**.

[2] Число клинических образцов, контроли этапа выделения ДНК (N) , контроли этапа ПЦР с запасом на один образец (N+2+1).

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

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

Таблица 7

Программа амплификации

	Приборы роторного типа[3]			**Приборы планшетного типа[4]**		
Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	**95**	15 мин	1	**95**	15 мин	1
2	**95**	10 с	45	**95**	10 с	45
3	**60**	25 с детекция флуоресц. сигнала		**60**	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с		**72**	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM, JOE и ROX (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

8. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
9. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
10. По окончании выполнения программы приступить к анализу и учету результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам: FAM/Green, JOE/Yellow/HEX и ROX/Orange.

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.

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 8 и вкладышем к набору реагентов **«АмплиСенс® *Yersinia enterocolitica / pseudotuberculosis*-FL»**.

[3] Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q или аналогичные.
[4] Например, iCycler, iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» или аналогичные.

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

Таблица 8

Интерпретация результатов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Значение порогового цикла			Результат
	Канал FAM	**Канал HEX**	**Канал ROX**	
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT Y.enterocolitica / Y.pseudotuberculosis	**Меньше** граничного значения	Значение отсутствует или больше граничного значения	Значение отсутствует или больше граничного значения	В пробе не выявлена ДНК *Y.enterocolitica* и *Y.pseudotuberculosis*
	Больше или меньше граничного значения	**Меньше** граничного значения	Больше или меньше граничного значения	В пробе выявлена ДНК *Y.pseudotuberculosis*
	Больше или меньше граничного значения	Больше или меньше граничного значения	**Меньше** граничного значения	В пробе выявлена ДНК *Y.enterocolitica*
	Больше граничного значения	Больше граничного значения	Больше граничного значения	Результат **невалидный** - проба требует повторной экстракции и амплификации
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Yersinia enterocolitica* type	**Меньше** граничного значения	Больше или меньше граничного значения	Больше или меньше граничного значения	В пробе выявлен фактор вирулентности *Y.enterocolitica - локус прикрепления и инвазии - Ail*
	Больше или меньше граничного значения	**Меньше** граничного значения	Больше или меньше граничного значения	В пробе выявлен фактор вирулентности *Y.enterocolitica – энтеротоксин - Yst*
	Больше или меньше граничного значения	Больше или меньше граничного значения	**Меньше** граничного значения	В пробе выявлен фактор вирулентности *Y.enterocolitica - плазмидный ген адгезина – yadA*
	Больше граничного значения	Больше граничного значения	Больше граничного значения	В пробе не выявлены факторы вирулентности *Y.enterocolitica*

ВНИМАНИЕ! Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к ПЦР-комплекту. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс® *Yersinia enterocolitica / pseudotuberculosis*-FL», разработанные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

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

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. 9).

Таблица 9

Результаты контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь-1	Конт-роль	Контроли-руемый этап	Канал FAM	Канал HEX	Канал ROX
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Y.enterocolitica / Y.pseudotuberculosis*	ОК	Экстракция ДНК	**Меньше** граничного значения	значение отсутствует или больше граничного значения	значение отсутствует или больше граничного значения
	К-	ПЦР	значение отсутствует или больше граничного значения	значение отсутствует или больше граничного значения	значение отсутствует или больше граничного значения
	К+	ПЦР	**Меньше** граничного значения	**Меньше** граничного значения	**Меньше** граничного значения
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Yersinia enterocolitica* type	ОК	Экстракция ДНК	значение отсутствует или больше граничного значения	значение отсутствует или больше граничного значения	значение отсутствует или больше граничного значения
	К-	ПЦР	значение отсутствует или больше граничного значения	значение отсутствует или больше граничного значения	значение отсутствует или больше граничного значения
	К+	ПЦР	**Меньше** граничного значения	**Меньше** граничного значения	**Меньше** граничного значения

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по каналам HEX, FAM или ROX отсутствует или больше граничного значения, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не была

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

обнаружена ДНК штаммов *Yersinia enterocolitica* на соответствующем типе ПЦР-смеси-1.

2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) (кроме **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Y.enterocolitica* / *Y.pseudotuberculosis*** по каналу FAM) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) (по всем каналам) сигнал меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК соответствующих патогенов***,*** начиная с этапа выделения (экстракции) ДНК.

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

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С (кроме **ПЦР-смеси-1 FEP/FRT *Y.enterocolitica / Y.pseudotuberculosis***, **ПЦР-смеси-1-FEP/FRT *Yersinia enterocolitica* type**, **ПЦР-смеси-2-FRT**, **полимеразы (TaqF)**). **ПЦР-смесь-1 FEP/FRT *Y.enterocolitica / Y.pseudotuberculosis***, **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Yersinia enterocolitica* type**, **ПЦР-смесь-2-FRT** и **полимеразу (TaqF)** хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

Рекламации на качество набора реагентов **«АмплиСенс® *Yersinia enterocolitica / pseudotuberculosis*-FL»** направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23 e-mail: obtk@pcr.ru, и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Отзывы и предложения о продукции **«АмплиСенс®»** можно оставить, заполнив анкету потребителя на сайте www.amplisens.ru.

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний
Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК
им.Тарасевича Роспотребнадзора — Г.М.Игнатьев

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