

Приказом Росздравнадзора
от 21.06.13г. № 2620-17п/13

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
«07» 12 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления и дифференциации ДНК
Ancylostoma duodenale и *Necator americanus*
в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс[®] Анкилостомозы-FL»

АмплиСенс[®]



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

IVD

СОДЕРЖАНИЕ

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....	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	9
ФОРМАТ FEP	10
СОСТАВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	10
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	11
А. Подготовка пробирок для амплификации	11
Б. Проведение амплификации	13
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	14
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	15
ФОРМАТ FRT	17
СОСТАВ	17
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	17
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	18
А. Подготовка пробирок для амплификации	18
Б. Проведение амплификации	20
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	21
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	24
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	25

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО-FL	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией
В-	- отрицательный контроль экстракции
К+	- положительный контроль ПЦР
К-	- отрицательный контроль ПЦР
ОКО	- отрицательный контрольный образец
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
FEP	- детекция по «конечной точке»
FRT	- детекция в режиме «реального времени»
<i>A. duodenale</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i>
<i>N. americanus</i>	<i>Necator americanus</i>

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® Анкилостомозы-FL» предназначен для выявления и дифференциации ДНК *Ancylostoma duodenale* и *Necator americanus* в клиническом материале (образцах фекалий) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания¹.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК *Ancylostoma duodenale* и *Necator americanus* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию (выделение) ДНК из образцов клинического материала, ПЦР-амплификацию участка ДНК данного микроорганизма и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится либо непосредственно в ходе ПЦР (формат FRT), либо после ее завершения (формат FEP). Экстракция ДНК из клинического материала проводится в 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

¹ В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/ЕС.

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 формата FEP осуществляется после окончания ПЦР с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, а при использовании формата FRT – непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

В наборе реагентов применяется «горячий старт», что значительно снижает количество неспецифических реакций. «Горячий старт» обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы (TaqF), которая активируется при прогреве реакционной смеси при температуре 95 °С в течение 15 мин.

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FEP/FRT

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

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

Форма 2 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК *A. duodenale* и *N. americanus* 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 ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 2 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Форма комплектации 2 используется только в соответствии с регламентом, утвержденным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Патоген	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
<i>Ancylostoma duodenale</i>	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» Вариант FEP/FRT-50 F	5x10 ³ ГЭ/мл
<i>Necator americanus</i>	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» Вариант FEP/FRT-50 F	5x10 ³ ГЭ/мл

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов и образцах ДНК: *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Trichuris trichiura*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis* ГИСК 29212, *Escherichia coli* NCTC 9001, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* ГИСК 11137, *Salmonella typhi* Central Public Health Laboratory (London) 5715, *Shigella flexneri* 2a ГИСК 1270, *Shigella sonnei* ГИСК 9090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*. Специфичность тестирования подтверждалась методом секвенирования детектируемых участков генома.

При проведении тестирования данной панели, 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», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы

амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- 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.
- 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), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.
3. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-«Ламинар.-с», «Ламинарные системы», Россия).
4. Центрифуга/вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл) (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах (например, Ахуген, США).
7. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов) (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.
10. Емкость для сброса наконечников.

При детекции по «конечной точке»:

11. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, США), GeneAmp

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

При детекции в режиме «реального времени»:

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), Cycler iQ5 (Bio-Rad, США), CFX96 (Bio-Rad, США), Mx3000P (Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.
15. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с круглой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками (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

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики»,

разработанными ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служат образцы фекалий.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К 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.

ФОРМАТ FEP

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *A. duodenale* и *N. americanus* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Ancylostoma / Necator / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Ancylostoma / Necator / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ²	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
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 ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация.
- Флуоресцентная детекция продуктов амплификации по «конечной точке».
- Интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК *A.*

² Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).

duodenale и *N. americanus* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Анкилостомозы-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «ДНК-сорб В», «РИБО-преп» и другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве отрицательного контроля экстракции (В–) используют **ОКО**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

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 образца ДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительного контроля (К+), отрицательного контроля (К–)) и двух пробирок «Фон». Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. До начала работы разморозить реагенты набора, хранящиеся при температуре не выше минус 16 °С. Все реагенты набора тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов ДНК реагентов и пробирок «Фон».
3. Для приготовления реакционной смеси и смеси для пробирок «Фон» необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Ancylostoma* / *Necator* / *STI* и ПЦР-смесь-2-FRT согласно табл. 1. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Приготовить 2 пробирки «Фон». Для этого внести по 15 мкл приготовленной смеси (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		Объем реагентов на указанное кол-во реакций, мкл		
		10.00	5.00	0.50
Число клинических образцов	Число реакций ³	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимераза (TaqF)
2	8	80	40	3,0
4	10	100	50	4,0
6	12	120	60	5,0
8	14	140	70	6,0
10	16	160	80	7,0
12	18	180	90	8,0
14	20	200	100	9,0
16	22	220	110	10,0
18	24	240	120	11,0
20	26	260	130	12,0
22	28	280	140	13,0
24	30	300	150	14,0
26	32	320	160	15,0
28	34	340	170	16,0

5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить полимеразу (TaqF) в количестве, указанном в табл. 1. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли

³ Число клинических образцов + контроль этапа экстракции ДНК + 2 контроля этапа ПЦР + 2 пробирки «Фон» + запас на один образец (N+1+2+2+1, где N-количество клинических образцов).

с крышки пробирки.

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемого в реакционную смесь фермента полимеразы (TaqF), указанное в табл. 1, приведено с учетом уже отобранных 30 мкл реакционной смеси для 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. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

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

8. Поставить контрольные реакции амплификации:

а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;

б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Ancylostoma* / *Necator* / STI**;

в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

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

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу амплификации (см. табл.2).

Программа амплификации

Амплификаторы с активным регулированием температуры (по раствору в пробирке):							Амплификаторы с матричным регулированием температуры:		
GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология»)			GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cycler (Corbett Research)				Uno-2 (Biometra), MiniCycler, PTC-100 (MJ Research)		
цикл	температура	время	кол-во циклов	температура	время	кол-во циклов	температура	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	

2. 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

Соответствие мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Выявляемая мишень
FAM ⁴	ДНК ВКО-FL
JOE ⁴	ДНК <i>N. americanus</i>
ROX ⁴	ДНК <i>A. duodenale</i>

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программном обеспечении ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки – см. вкладыш, прилагаемый к набору реагентов, а также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *A. duodenale* и *N. americanus* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-

⁴ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Анкилостомозы-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии 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 и методические рекомендации к инструкции).

Таблица 4

Интерпретация результатов ПЦР-исследования клинических образцов

Уровень флуоресценции			Результат
Канал для флуорофора FAM	Канал для флуорофора JOE	Канал для флуорофора ROX	
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена ДНК <i>A. duodenale</i> и <i>N. americanus</i>
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлена ДНК <i>N. americanus</i>
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК <i>A. duodenale</i>
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Результат невалидный - проба требует повторной экстракции и амплификации

Если значение уровня флуоресценции для пробы находится между пороговыми значениями положительного и отрицательного результата, он расценивается как **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 экстракции ДНК в соответствии с табл. 5.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап	Сигнал по каналу для флуорофора			Обозначение результата в программах некоторых детекторов
		FAM	JOE	ROX	
B-	Экстракция ДНК	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	«-» или «ОК»
K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	«нд»
K+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	«+» или «ОК»

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля амплификации (K+) сигнал по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *A. duodenale* и *N. americanus*.
2. Если для отрицательного контроля выделения ДНК (B-) и/или отрицательного контроля амплификации (K-) по каналам для флуорофоров JOE и/или ROX сигнал выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *A. duodenale* и *N. americanus*, начиная с этапа экстракции ДНК.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» формат FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации участков ДНК *A. duodenale* и *N. americanus* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Ancylostoma / Necator / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Ancylostoma / Necator / STI</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ⁵	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы экстракции:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
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 ДНК из исследуемых образцов.
- Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования в зависимости от используемого оборудования изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК *A. duodenale* и *N. americanus* в клиническом материале методом

⁵ Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).

полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Анкилостомозы-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «ДНК-сорб В», «РИБО-преп» и другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией к используемому комплекту.

Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО-FL). В качестве отрицательного контроля экстракции (В-) используют **ОКО**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

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

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. 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-)). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

1. До начала работы разморозить реагенты набора, хранящиеся при температуре не выше минус 16 °С. Все реагенты набора тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельной стерильной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Ancylostoma* / *Necator* / STI**, **ПЦР- смесь-2-FRT** и **полимеразу (TaqF)** в количестве, указанном в таблице 6. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
4. Внести в отобранные пробирки по **15 мкл** готовой реакционной смеси.

Таблица 6

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

Объем реагента на одну реакцию, мкл		Объем реагентов на указанное кол-во реакций, мкл		
		10,0	5,0	0,5
Число клинических образцов	Число реакций ⁶	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимеразы (TaqF)
2	6	60	30	3,0
4	8	80	40	4,0
6	10	100	50	5,0
8	12	120	60	6,0
10	14	140	70	7,0
12	16	160	80	8,0
14	18	180	90	9,0
16	20	200	100	10,0
18	22	220	110	11,0
20	24	240	120	12,0
22	26	260	130	13,0
24	28	280	140	14,0
26	30	300	150	15,0
28	32	320	160	16,0

5. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл ДНК-проб**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

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

⁶ Число клинических образцов + контроль этапа экстракции ДНК + 2 контроля этапа ПЦР + запас на один образец (N+1+2+1, где N-количество клинических образцов).

6. Поставить контрольные реакции амплификации:
- а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Ancylostoma* / *Necator* / STI**;
 - в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 7 и методические рекомендации к инструкции).

Таблица 7

Программа амплификации для приборов роторного⁷ и планшетного типа⁸

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45
	60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по трем каналам - для флуорофоров FAM⁹, JOE⁹ и ROX⁹ (при одновременном проведении нескольких тестов назначается детекция и по другим используемым каналам).

2. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
3. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
4. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

⁷ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁸ Например, iCycler iQ5, Mx3000P, Mx3000, CFX96, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению набора реагентов «АмплиСенс[®] Анкилостомозы-FL».

⁹ Название каналов детекции для соответствующего прибора см. в методических рекомендациях к набору реагентов.

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:

- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *N. americanus*.
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *A. duodenale*.

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® Анкилостомозы-FL».

**Интерпретация результатов ПЦР-исследования
клинических образцов**

Значение порогового цикла, <i>Ct</i>			Результат
по каналу для флуорофора FAM	по каналу для флуорофора JOE	по каналу для флуорофора ROX	
<u>Меньше</u> граничного значения	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	В пробе не выявлена ДНК <i>A. duodenale</i> и <i>N. americanus</i>
<u>Больше или меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Больше или меньше</u> граничного значения	В пробе выявлена ДНК <i>N. americanus</i>
<u>Больше или меньше</u> граничного значения	<u>Больше или меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	В пробе выявлена ДНК <i>A. duodenale</i>
<u>Отсутствует или больше</u> граничного значения	<u>Отсутствует или больше</u> граничного значения	<u>Отсутствует или больше</u> граничного значения	Результат невалидный - проба требует повторной экстракции и амплификации

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов. См. также методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *A. duodenale* и *N. americanus* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс[®] Анкилостомозы-FL», разработанные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей 9.

Результаты контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>		
		по каналу для флуорофора FAM	по каналу для флуорофора JOE	по каналу для флуорофора ROX
В–	Экстракция ДНК	<u>Меньше</u> граничного значения	значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения
К–	ПЦР	значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения	значение отсутствует или <u>больше</u> граничного значения
К+	ПЦР	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения	<u>Меньше</u> граничного значения

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля этапа ПЦР (К+) значение порогового цикла *Ct* по каналу для флуорофоров JOE и/или ROX отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не была выявлена ДНК *A. duodenale* и *N. americanus*.
2. Если для отрицательного контроля этапа экстракции ДНК (В–) и/или отрицательного контроля этапа ПЦР (К–) по каналу для флуорофоров JOE и/или ROX значение порогового цикла *Ct* меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *A. duodenale* и/или *N. americanus*, начиная с этапа экстракции 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 FEP/FRT-50 F при получении разуконплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Ancylostoma / Necator / STI*, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Ancylostoma / Necator / STI* хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® **Анкилостомозы-FL**» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) и в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)¹⁰

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
Управления делами Президента
Российской Федерации



Е.Л. Никонов

¹⁰ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

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
	Производитель		Дата изготовления