

Приказом Росздравнадзора
от 25.09.2012г. № 1000-Пп/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
« 18 » 09 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Trichuris trichiura* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс[®] *Trichuris trichiura*-FL»

АмплиСенс[®]



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	5
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК.....	9
ФОРМАТ FEP	10
СОСТАВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	10
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	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
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	18
А. Подготовка пробирок для амплификации	18
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	20
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	21
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	23
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	24

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

В–	- отрицательный контроль этапа экстракции ДНК/РНК
ВКО-FL	- внутренний контрольный образец
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	- флуоресцентная детекция по «конечной точке»
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Trichuris trichiura*-FL» предназначен для выявления ДНК *Trichuris trichiura* в клиническом материале (образцах фекалий) методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление ДНК *Trichuris trichiura* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию ДНК из образцов клинического материала, амплификацию участка ДНК данного организма 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 *Trichuris trichiura* 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

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

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. Химически модифицированная полимеразы (TaqF) активируется при прогреве реакционной смеси при 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 фрагмента ДНК *Trichuris trichiura* с гибридно-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

Вид клинического материала	Комплект для экстракции ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность ² , ГЭ/мл
Фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 ³

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов:

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 кис-

² Количество геномных эквивалентов организма (ГЭ) в 1 мл образца клинического материала.

лот 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.
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с 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.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны 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).
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 штативах.
7. Штативы для пробирок 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 1.3.2569-09.
10. Емкость для сброса наконечников.

При детекции по «конечной точке»:

11. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), Uno-2 (Biometra, Германия)).
12. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan,

Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия)).

13. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 или 0,5 мл (с плоской крышкой, нестрипованные):

а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок объемом 0,2 мл (например, Gradient Palm Cycler (Corbett Research, Австралия), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США)).

б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для пробирок объемом 0,5 мл (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия)).

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), iCycler iQ5 (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», разработан-

ными ФГУН ЦНИИЭ 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 фрагмента ДНК *Trichuris trichiura* 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>Trichuris trichiura</i> / STI	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>Trichuris trichiura</i> / ST	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР ³	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.
- Проведение амплификации.
- 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 ре-

³Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия).

агентов для выявления ДНК *Trichuris trichiura* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Trichuris trichiura*-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–) используется реагент **ОКО**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

А. Подготовка пробирок для амплификации.

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

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.

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 с учетом исследуемых и контрольных проб и пробирок «Фон».
 3. Для приготовления реакционной смеси и смеси для пробирок «Фон» необходимо в отдельной пробирке смешать ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Trichuris trichiura* /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 добавить по 1 капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл) (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).

Таблица 1

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

		Объем реагентов на указанное кол-во реакций, мкл		
Объем реагента на одну реакцию, мкл		10,0	5,0	0,5
Число клинических образцов	Число реакций ⁴	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Trichuris trichiura</i> /STI	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

⁴ 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).

5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить **полимеразу (TaqF)** в количестве, указанном в 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. 1, 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** готовой реакционной смеси. Сверху добавить по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно **25 мкл**) (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).

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

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

8. 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 *Trichuris trichiura* / 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).

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и проб ДНК и контролей.

Б. Проведение амплификации

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

2. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Программа амплификации ДНК

		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 °С	пауза		95 °С	Пауза		95 °С	пауза		
1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1	
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42	95 °С	1 мин	42	
	60 °С	10 с		60 °С	25 с		60 °С	1 мин		
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	1 мин		
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	
4	10 °С	хранение		10 °С	хранение		10 °С	хранение		

3. 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 двум каналам.

Таблица 3

Схема соответствия тестируемых мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал детекции	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Trichuris trichiura</i> / STI
FAM	ДНК ВКО-FL
HEX	ДНК <i>Trichuris trichiura</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 *Trichuris trichiura* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Ампли-Сенс® *Trichuris trichiura*-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 по применению данного набора реагентов).

Таблица 4

Интерпретация результатов ПЦР-исследования клинических образцов

Сигнал по каналу		Результат
FAM	HEX	
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена ДНК <i>Trichuris trichiura</i>
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена ДНК <i>Trichuris trichiura</i>
<u>Ниже</u> порогового значения	<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 ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		Обозначение результата в программах некоторых детекторов
		FAM	HEX	
B-	Экстракция ДНК	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	«-» или «ОК»
K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	«нд»
K+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	«+» или «ОК»

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля амплификации (K+) сигнал по каналу HEX ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Trichuris trichiura*.
2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (B-) и/или отрицательного контроля амплификации (K-) по каналу HEX сигнал выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Trichuris trichiura*, начиная с этапа экстракции ДНК.

ФОРМАТ FRT**СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации фрагмента ДНК *Trichuris trichiura* 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>Trichuris trichiura</i> / STI	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>Trichuris trichiura</i> / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	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.
- Проведение амплификации с 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 ДНК *Trichuris trichiura* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Trichuris trichiura*-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются комплекты реагентов «ДНК-сорб-В», «РИБО-преп» или 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–) используется реагент **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.

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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. табл. 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.

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 с учетом исследуемых и контрольных проб.
 3. Для приготовления реакционной смеси необходимо в отдельной пробирке смешать **ПЦР-смесь-1-FEP/FRT *Trichuris trichiura* / STI**, **ПЦР-смесь-2-FRT** и **полимеразу (TaqF)** в количестве, указанном в табл. 6. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
 4. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной 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 ⁵	ПЦР-смесь-1-FEP/FRT <i>Trichuris trichiura</i> / STI	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимераза (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 пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых образцов. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

⁵ Число клинических образцов + контроль этапа экстракции ДНК + 2 контроля этапа ПЦР + запас на один образец (N+1+2+1, где N-количество клинических образцов).

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

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 *Trichuris trichiura* / STI**;
- в) **отрицательный контроль экстракции (В–)** – внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из ОКО.

Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

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

Таблица 7

Программа амплификации для приборов роторного типа⁶ и планшетного типа⁷

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

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

⁶ Например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

⁷ Например, iCycler iQ5, Mx3000P, «ДТ-96» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов.

4. 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-FL,
- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Trichuris trichiura*.

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, прилагаемым к набору реагентов «АмплиСенс® *Trichuris trichiura*-FL».

Таблица 8

Интерпретация результатов ПЦР-исследования клинических образцов

Значение порогового цикла <i>Ct</i> по каналу		Результат
FAM/Green	JOE/Yellow/HEX	
Определено значение <u>меньше</u> граничного	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного	В пробе не выявлена ДНК <i>Trichuris trichiura</i>
Определено значение <u>больше</u> или <u>меньше</u> граничного	Определено значение <u>меньше</u> граничного	В пробе выявлена ДНК <i>Trichuris trichiura</i>
<u>Отсутствует</u> или <u>больше</u> граничного значения	<u>Отсутствует</u> или <u>больше</u> граничного значения	Результат невалидный – проба требует повторной экстракции и амплификации

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше, прилагаемом к набору реагентов.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и

отрицательного контролей амплификации и отрицательно-го контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 9).

Таблица 9

Результаты контролей различных этапов ПЦР-исследования

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, <i>Ct</i>	
		По каналу FAM/Green	По каналу JOE/Yellow/HEX
B–	Экстракция ДНК	Определено значение <u>меньше</u> граничного	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного
K–	ПЦР	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного	Значение отсутствует или <u>больше</u> граничного
K+	ПЦР	Определено значение <u>меньше</u> граничного	Определено значение <u>меньше</u> граничного

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля этапа ПЦР (K+) значение порогового цикла *Ct* по каналу JOE/Yellow/HEX отсутствует или больше граничного значения, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не была выявлена ДНК *Trichuris trichiura*.
2. Если для отрицательного контроля этапа экстракции ДНК (B–) и/или отрицательного контроля этапа ПЦР (K–) по каналу JOE/Yellow/HEX значение порогового цикла *Ct* меньше граничного значения, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Trichuris trichiura*, 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 разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

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

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Trichuris trichiura*-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).⁸

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

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



Е.Л. Никонов

⁸ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF

Номер в каталоге



Осторожно! Обратитесь к сопроводительной документации

LOT

Код партии



Максимальное число тестов

IVD

Изделие для in vitro диагностики



Использовать до

VER

Дата изменения



Обратитесь к руководству по эксплуатации



Ограничение температуры



Не допускать попадания солнечного света



Верхнее ограничение температуры



Дата изготовления



Производитель