

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 11.04.12г. № 17/5-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
«24» февраля 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Bordetella* multi-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.....	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	7
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	9
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА..	11
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	12
ФОРМАТ FRT	13
СОСТАВ.....	13
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	15
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	16
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	17
А. Подготовка пробирок для амплификации	17
А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT	17
А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F	18
Б. Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»	18
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	26
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	28
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Таблица приготовления реакционных смесей.....	35
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	36

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВК+	- положительный контроль амплификации образца ВКО
ВКО STI-87	- внутренний контрольный образец
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
К-	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FRT	- флуоресцентная детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*» предназначен для выявления и дифференциации специфических фрагментов генома возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации.

Материалом для исследования служат мазки со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки, а также культуры микроорганизмов.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Полный анализ включает следующие этапы: экстракцию ДНК возбудителей из образцов клинического материала, амплификацию участков геномов микроорганизмов и гибридизационно-флуоресцентную детекцию сигнала, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК микроорганизмов из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), использование которого позволяет контролировать качество

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

выполнения процедуры исследования для каждого образца. Амплификация проводится при участии олигонуклеотидов (праймеров), специфичных к ДНК-мишеням, и фермента Taq-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды, которые гибридизуются с комплементарными участками амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала во время амплификации.

На этапе амплификации одновременно в одной пробирке проводятся четыре реакции – амплификация консервативного участка гена *ptxA*, кодирующего коклюшный токсин, представленного в геномах *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* и *Bordetella bronchiseptica*; идентификация специфических участков в геномах *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica*, а также амплификация последовательности внутреннего контрольного образца:

Канал детекции	FAM	JOE	ROX	Cy5
Реакция	Детекция ВКО	Обнаружение гена коклюшного токсина, <i>ptxA</i>	Идентификация <i>Bordetella pertussis</i>	Идентификация <i>Bordetella bronchiseptica</i>

В случае обнаружения в образце коклюшного токсина (канал для флуорофора JOE) делается вывод о наличии одного из микроорганизмов, принадлежащих роду *Bordetella* (*B.pertussis*, *B.parapertussis* или *B.bronchiseptica*).

В случае одновременного получения положительных результатов по каналам для флуорофоров JOE и ROX делается вывод о наличии в образце *Bordetella pertussis*. В случае одновременного получения положительных результатов по каналам для флуорофоров JOE и Cy5 делается вывод о наличии в образце *Bordetella bronchiseptica*.

Сделать вывод о наличии в исследуемом образце *Bordetella parapertussis* можно в случае обнаружения в образце коклюшного токсина (канал для флуорофора JOE) и получения отрицательных результатов в реакциях идентификации *Bordetella pertussis* и *Bordetella bronchiseptica* при условии

содержания достаточного количества ДНК *Bordetella*, что определено пороговыми значениями, указанными в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL».

ФОРМАТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 формате.

Формат FRT

Набор реагентов выпускается в 7 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 2 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 3 включает комплекты реагентов «РИБО-сорб» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 4 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (пробирки 0,2 мл в соответствии с типом амплификатора).

Форма 6 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F.

Форма 7 включает наборы реагентов оптом, расфасованные по отдельным реагентам, с маркировкой реагентов на их оптовой фасовке.

Формы комплектации 1, 2, 3 и 4 предназначены для проведения полного ПЦР-исследования, включающего экстракцию ДНК из биологического материала и амплификацию ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 5 и 6 предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции ДНК/РНК, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Форма комплектации 7 предназначена для производственных целей для последующей маркировки на языке заказчика и комплектации по наборам.

ВНИМАНИЕ! Использование формы комплектации 7 производится только в соответствии с регламентом,

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность при исследовании мазков со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки

Возбудитель	Комплект для выделения ДНК/РНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность ГЭ/мл ²
<i>Bordetella pertussis</i> (возбудитель коклюша)	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT, вариант FRT-100 F	1x10 ³
	«РИБО-преп»		5x10 ²
	NucliSENS easyMAG		5x10 ²
<i>Bordetella parapertussis</i> (возбудитель паракоклюша)	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT, вариант FRT-100 F	1x10 ³
	«РИБО-преп»		5x10 ²
	NucliSENS easyMAG		5x10 ²
<i>Bordetella bronchiseptica</i> (возбудитель бронхисептикоза)	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FRT, вариант FRT-100 F	1x10 ³
	«РИБО-преп»		5x10 ²
	NucliSENS easyMAG		5x10 ²

Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК заявленных возбудителей. Аналитическая специфичность набора реагентов доказана при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Streptococcus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacteria tuberculosis* 27294 105, *Neisseria flava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *E. coli* ATCC, NCTC, 01577 27u7, *Enterococcus faecalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella Enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, а также геномной ДНК человека.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней,

² Чувствительность выражается в геномных эквивалентах (ГЭ) возбудителя в 1 мл пробы.

с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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 хранить 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 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.

- 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 реагентов 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. Транспортная среда для хранения и транспортировки респираторных мазков (ТУ 9398-083-01897593-2009) – реагент для хранения мазков из полости носа и ротоглотки.
2. Педиатрический назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (516CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у детей.
3. Гибкий назофарингеальный велюр-тампон на пластиковом аппликаторе (503CS01, COPAN, Италия) – зонд для взятия мазков со слизистой нижнего носового хода у взрослых.
4. Зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный (300202, Deltalab, Испания) – зонд для взятия мазков из ротоглотки у детей и взрослых.
5. 0,9% раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатном буфере, рН 7,0 – в случае исследования культур микроорганизмов.
6. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (для форм комплектации 5 и 6).
7. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК/РНК.
8. Автоматическая станция для выделения ДНК/РНК (например, NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Франция) – при использовании автоматических станций для экстракции

- нуклеиновых кислот (для форм комплектации 5 и 6).
9. Набор реактивов и расходных материалов к автоматической станции (например, NucliSENS easyMAG (NucliSens буфер для экстракции 1, NucliSens буфер для экстракции 2, NucliSens буфер для экстракции 3, NucliSens буфер для лизиса, NucliSens магнитная силика) (bioMérieux, Франция)) – при использовании автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот (для форм комплектации 5 и 6).
 10. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
 11. Центрифуга/вортекс.
 12. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл).
 13. Одноразовые наконечники с фильтром до 10, 100, 200 мкл.
 14. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл и 0,1 мл.
 15. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой не выше минус 16 °C.
 16. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
 17. Емкость для сброса наконечников.
 18. Программируемый амплификатор роторного типа (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) или амплификатор планшетного типа (например, iCycler iQ5 и iCycler iQ (Bio-Rad, США), «ДТ-96» «ДНК-Технология» и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов).
 19. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл или 0,1 мл – при работе с «ПЦР-комплектom» вариант FRT-100 F:
 - а) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой крышкой (например, Axugen, США) – при использовании прибора планшетного типа;
 - б) тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axugen, США) 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 ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Все работы по взятию, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Материалом для исследования служат:

- мазки со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки,
- культуры микроорганизмов.

Взятие мазков со слизистой нижнего носового хода

Мазки берут сухим стерильным назофарингеальным вельюр-тампоном на пластиковом аппликаторе. Если полость носа заполнена слизью, перед процедурой рекомендуется провести высмаркивание. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем зонд слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с тампоном) помещают до места слома в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть крышку пробирки. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают и маркируют.

Взятие мазков из ротоглотки

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами с вязкими тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки

ротоглотки.

После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с вязким тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с 500 мкл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков. Конец зонда отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку с раствором и рабочей частью зонда закрывают, маркируют.

ВНИМАНИЕ! При взятии мазков рекомендуется совмещать мазки из полости носа и ротоглотки в одной пробирке. Для этого сначала берут мазки разными зондами со слизистой нижнего носового хода, а затем из ротоглотки, при этом рабочие концы зондов после взятия мазков у пациента помещаются в одну пробирку с 0,5 мл транспортной среды для хранения и транспортировки респираторных мазков и исследуются как один образец.

Допускается хранение клинического материала до проведения исследования в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С или 1 нед – при температуре не выше минус 16 °С.

Культуры микроорганизмов:

Колонию микроорганизмов ресуспендировать в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатном буфере, рН 7,0. Полученную суспензию использовать для дальнейшей работы.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

Мазки со слизистой нижнего носового хода и задней стенки ротоглотки: содержимое закрытой пробирки перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс g на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.

ФОРМАТ FRT

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-сорб» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Вариант 50</i>		<i>Вариант 100</i>	
		<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость ³	22,5	1 флакон	45	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость ³	20	1 флакон	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон	100	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон	40	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка	1,25	2 пробирки
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	5 пробирок	0,5	10 пробирок

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 50 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 1.

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 3.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Вариант 50</i>		<i>Вариант 100</i>	
		<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета ⁴	15	1 флакон	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки	1,2	8 пробирок

³ При хранении лизирующего раствора и раствора для отмывки 1 при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

⁴ При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ФОРМАТ FRT

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

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на выделение РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав формы комплектации 4.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для амплификации и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL <i>Bordetella multi</i> раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	55 пробирок объемом 0,2 мл
ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Bordetella spp.</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

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

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа экстракции:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F – комплект реагентов для амплификации и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» – **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем, мл</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1-FL-F <i>Bordetella multi</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	5 пробирок
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Bordetella spp.</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО STI-88	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ТЕ-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 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>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	2 пробирки

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

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

Детальная информация по процедуре проведения ПЦР-исследования, в зависимости от типа используемого оборудования, изложена в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella multi-FL*», разработанных ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Для экстракции ДНК используются наборы реагентов, рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Порядок работы с комплектами реагентов «РИБО-сорб», «РИБО-преп», **автоматической станцией NucliSENS easyMAG** (производства bioMérieux, Франция) и набором реактивов и расходных материалов NucliSENS easyMAG описан в приложении 1.

ВНИМАНИЕ! Экстракция ДНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца – **ВКО STI-87**. В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют препарат **ОКО**.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

А. Подготовка пробирок для амплификации

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

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

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

А1. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL *Bordetella multi*** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Убедиться, что воск полностью покрывает раствор на дне пробирок.
2. На поверхность воска внести по **7 мкл ПЦР-смеси-2-FL**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1-FL *Bordetella multi***.
3. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
4. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Bordetella spp.***
 - в) **положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО STI-88**.
 - г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – 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).

А2. Подготовка пробирок для проведения амплификации при помощи комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

1. Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL-F *Bordetella multi***. Перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью-1-FL-F *Bordetella multi***, **ПЦР-смесью-2-FRT** и **полимеразой (TaqF)**, осадить капли кратковременным центрифугированием (1-2 с) с помощью центрифуги/вортекса.
2. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
3. Для проведения N реакций смешать в отдельной пробирке **10*(N+1) мкл ПЦР-смеси-1-FL-F *Bordetella multi***, **5*(N+1) мкл ПЦР-смеси-2-FRT**, и **0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**. (Расчетная таблица приготовления реакционных смесей в приложении 2).
4. Перемешать подготовленную смесь на вортексе и осадить капли кратковременным центрифугированием с помощью центрифуги/вортекса.
5. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной смеси.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл ТЕ-буфера**.
 - б) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК *Bordetella spp.***
 - в) **положительный контроль ПЦР ВКО (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО STI-88**.
 - г) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** - 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 с детекцией в режиме «реального времени»

1. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой

детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 1).

Таблица 1

Программа амплификации ДНК *Bordetella multi-FL*

Цикл	Приборы роторного типа ⁵			Приборы планшетного типа ⁶		
	Температура, °С	Время	Кол-во циклов	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-100 F)	1	95	5 мин (для варианта FRT) или 15 мин (для варианта FRT-100 F)	1
2	95	10 с	10	95	10 с	10
	60	20 с		60	25 с	
	72	10 с		72	25 с	
3	95	10 с	35	95	10 с	35
	60	20 с детекция флуоресц. сигнала		60	25 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с		72	25 с	

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX и Cy5.

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.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов с установленной на соответствующем

⁵ например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов

⁶ например, «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия), iCycler iQ5, iCycler iQ (Bio-Rad, США) и рекомендованные ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора в методических рекомендациях по применению данного набора реагентов

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

Принцип анализа результатов амплификации следующий:

Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам (FAM, JOE, ROX и Cy5):

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Реакция	Детекция ВКО	Обнаружение гена коклюшного токсина, <i>ptxA</i>	Идентификация <i>Bordetella pertussis</i>	Идентификация <i>Bordetella bronchiseptica</i>

- по каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента гена коклюшного токсина, имеющегося в геномах *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* и *Bordetella bronchiseptica*;
- по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации специфического участка генома *Bordetella pertussis*;
- по каналу для флуорофора Cy5 регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации специфического участка генома *Bordetella bronchiseptica*;
- по каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО STI-87.

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, и значение порогового цикла *Ct* для данного канала менее указанного граничного, **отрицательным** – в случае отсутствия кривой типичной формы, не пересекающейся с пороговой линией (нет значения *Ct*) или если определено значение порогового цикла *Ct*, превышающее указанное граничное значение.

ВНИМАНИЕ! Граничные пороговые значения *Ct* указаны во вкладыше, **прилагаемом к набору реагентов**, а также в «Методических Рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша

(*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL», разработанных ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

Результаты ПЦР-исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для положительных и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 2).

Таблица 2

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

Конт-роль	Контролируе-мый этап ПЦР-исследования	Значение порогового цикла, Ct			
		FAM	JOE	ROX	Cy5
		Детекция ВКО	Обнаружение коклюшного токсина	Идентификация <i>Bordetella pertussis</i>	Идентификация <i>Bordetella bronchiseptica</i>
OK	Экстракция ДНК/РНК	Определено значение <u>меньше</u> граничного	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
K-	ПЦР	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
BK+	ПЦР	Определено значение <u>меньше</u> граничного	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>
K+	ПЦР	<u>Отсутствует</u>	Определено значение <u>меньше</u> граничного	Определено значение <u>меньше</u> граничного	Определено значение <u>меньше</u> граничного

Принцип интерпретации результатов:

Интерпретация результатов ПЦР-исследования по выявлению и идентификации возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) проводится на основании сочетания результатов анализа амплификации в соответствии с таблицей 3.

Интерпретация результатов анализа исследуемых образцов

Варианты	FAM	JOE	ROX	Cy5	Результат
	Значение порогового цикла, Ct				
1	<u>Отсутствует или больше порогового значения</u>	<u>Отсутствует или присутствует, но больше порогового значения</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Невалидный
2	<u>Меньше порогового значения</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<i>B.pertussis</i> <i>B.parapertussis</i> <i>B.bronchiseptica</i> НЕ обнаружены
3	<u>Присутствует</u> /либо <u>Отсутствует</u>	<u>Присутствует</u>	<u>Присутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК: <i>B.pertussis</i>
4	<u>Присутствует</u> / либо <u>Отсутствует</u>	<u>Присутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Присутствует</u>	Обнаружена ДНК: <i>B.bronchiseptica</i>
5	<u>Присутствует</u> /либо <u>Отсутствует</u>	<u>Присутствует и меньше порогового значения</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК: <i>B.parapertussis</i>
6	<u>Меньше порогового значения</u>	<u>Присутствует, но больше порогового значения</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	Обнаружена ДНК <i>Bordetella</i> spp: <i>B.pertussis</i> , или <i>B.parapertussis</i> , или <i>B.bronchiseptica</i> . Для проведения видового типирования необходимо повторное взятие материала
7	<u>Меньше порогового значения</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Присутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	При повторении результата в ПЦР считать сомнительным
8	<u>Меньше порогового значения</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Отсутствует</u>	<u>Присутствует</u>	При повторении результата в ПЦР считать сомнительным

ВНИМАНИЕ! Пороговые значения Ct указаны в методических рекомендациях по применению набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша (*Bordetella pertussis*), паракоклюша (*Bordetella parapertussis*) и бронхисептикоза (*Bordetella bronchiseptica*) в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» и вкладыше к набору реагентов «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL».

- ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* **не обнаружены**, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров **JOE**, **ROX** и **Cy5** не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанного граничного.
- **Обнаружена** ДНК *B. pertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров **JOE** и **ROX** определяется значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- **Обнаружена** ДНК *B. bronchiseptica*, если для данной пробы в таблице результатов по каналам для флуорофоров **JOE** и **Cy5** определяется значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное граничное значение. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- **Обнаружена** ДНК *B. parapertussis*, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение *Ct* меньше порогового и отсутствуют значения порогового цикла *Ct* по каналам для флуорофоров **ROX** и **Cy5**. При этом для данной пробы должен наблюдаться характерный экспоненциальный подъем флуоресцентного сигнала. В таких образцах значение порогового цикла *Ct* в таблице результатов по каналу для

- ВКО (**FAM**) может быть любым или отсутствовать при высокой нагрузке возбудителя в исследуемом образце.
- Если для исследуемой пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора **JOE** определено значение Ct больше порогового и отсутствуют значения порогового цикла Ct по каналам для флуорофоров **ROX** и **Cy5**, а по каналу для ВКО (**FAM**) определено значение порогового цикла Ct , не превышающее указанного граничного, можно сделать вывод, что **обнаружена ДНК одного из представителей рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*)**, но для проведения видовой идентификации количества экстрагированной ДНК недостаточно, и при необходимости идентификации требуется повторное взятие клинического материала.
 - Если для исследуемой пробы в таблице результатов отсутствует значение порогового цикла Ct по каналу для флуорофора **JOE**, но определяется значение порогового цикла Ct по каналу для флуорофора **ROX** или **Cy5**, а по каналу для ВКО (**FAM**) значение порогового цикла Ct не превышает указанное (граничное) значение, требуется повторное исследование данной пробы с этапа ПЦР. При повторении результата считать данную пробу **сомнительной** и рекомендовать повторить взятие клинического материала для исследования.
 - Результат анализа считается **невалидным**, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла Ct по каналам для флуорофоров **ROX** и **Cy5**, по каналу для флуорофора **JOE** значение Ct отсутствует или превышает указанное граничное, и по каналу для ВКО (**FAM**) значение Ct также отсутствует или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца с этапа экстракции ДНК.

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить

амплификацию для всех отрицательных клинических образцов.

2. Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) по каналам для флуорофоров **JOE**, **ROX** и **Cy5** и/или отрицательного контроля ПЦР (K-) по любому из каналов зафиксировано значение порогового цикла *C_t*, необходимо повторить исследование для всех положительных образцов начиная с этапа экстракции, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. Для форм комплектации 1, 2, 5 (вариант FRT) – 9 мес. Для форм комплектации 3, 4, 6 (вариант FRT-100 F) – 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F при получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-2-FRT, ПЦР-смесь-1-FL-F *Bordetella* multi и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. ПЦР-смесь-1-FL *Bordetella* multi и ПЦР-смесь-1-FL-F *Bordetella* multi хранить в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Bordetella* multi-FL» направлять на предприятие-изготовитель ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)⁷.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Е.Н. Родионова

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»



А.Б. Жебрун

⁷ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для проведения экстракции ДНК/РНК из образцов).

А. При использовании комплекта реагентов «РИБО-сорб»
Объем клинического материала для экстракции ДНК – 100 мкл.

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре от 60 до 65 °С до полного растворения кристаллов.
 2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку по **450 мкл лизирующего раствора** и по **10 мкл ВКО STI-87**. Промаркировать пробирки.
 3. В пробирки с **лизирующим раствором** и **ВКО STI-87** внести по **100 мкл исследуемых проб**, используя наконечники с фильтром. Перемешать пипетированием.
- В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.
4. Плотные закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и центрифугировать в течение 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), центрифугировать при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в другие пробирки.
 5. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
 6. Центрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс об/мин в течение 30 с на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

7. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Повторить отмывку **раствором для отмывки 3**, следуя п. 8.
10. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для отмывки 4**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, центрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
11. Поместить пробирки в термостат с температурой 60 °С на 15 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
12. В пробирки добавить по **50 мкл РНК-буфера**, используя наконечники с фильтром, свободные от РНКаз. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой 60 °С на 2-3 мин. Перемешать на вортексе и центрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс об/мин) в течение 1 мин.

Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

Отбирать раствор для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, более длительно при температуре не выше минус 68 °С.

Б. При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»
ВНИМАНИЕ! Раствор для лизиса из данного набора реагентов имеет неприятный запах. Работу проводить в ламинарном боксе.

Объем клинического материала для экстракции ДНК – 100 мкл.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль экстракции). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87** и по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе, центрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин при 13 тыс об/мин**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Центрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.

11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **10 мкл** для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге.
17. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, более длительно при температуре не выше минус 68 °С.

В. При использовании автоматической станции для нуклеиновых кислот NucliSENS easyMAG (BioMerieux, Франция)

Объем клинического материала для ДНК – 100 мкл.

Вариант 1. Экстракция ДНК с лизисом образца вне прибора
Данный метод экстракции позволяет снизить расход буфера для лизиса NucliSens и предпочтительнее при работе с образцами клинического материала, содержащего сгустки (мокрота, аспираты).

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК/РНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для экстракции ДНК/РНК (установить *Other*), объем образца (*Volume*) – **0,1 ml**, объем элюции (*Eluate*) – **25 µl**, тип образца (*Type*) – *Lysed*, очередность экстракции ДНК в образцах (*priority*) – *Normal*.
3. Создать новый протокол экстракции ДНК/РНК и сохранить его. В протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит вне прибора: ***On-board Lysis Buffer Dispensing – No, On-board Lysis Incubation – No.***
4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество специализированных одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-87**. Добавить в пробирки по **550 мкл буфера для лизиса NucliSens**.

ВНИМАНИЕ! При работе с материалом, содержащем сгустки, лизис рекомендуется проводить в пробирках объемом 1,5 мл. После окончания инкубации (см. п. 8) следует провести центрифугирование пробирок при 10 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге и перенести надосадочную жидкость в специализированные пробирки, предназначенные для выделения ДНК/РНК в приборе NucliSENS easyMAG.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

6. В пробирки с **раствором для лизиса и ВКО STI-87**, внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром и тщательно перемешать пипетированием. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц.)
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО**.
8. Инкубировать пробирки в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Внести в каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
10. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов вне прибора (*off board*).
11. После окончания экстракции ДНК, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

При необходимости хранения очищенную ДНК следует перенести в стерильные пробирки не позднее 30 мин после выделения. Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, любого срока хранения при температуре не выше минус 68 °С.

Вариант 2. Экстракция ДНК с лизисом образца в приборе

Порядок работы

1. Включить прибор NucliSENS easyMAG и подготовить его к экстракции ДНК, следуя инструкции к прибору.
2. В окне для ввода исследуемых образцов ввести для каждого образца следующие параметры: название образца, материал (*Matrix*) для экстракции ДНК/РНК (установить *Other*), объем образца (*Volume*) – **0,1 ml**, объем элюции (*Eluate*) – **25 µl**, тип образца (*Type*) – *Primary*, очередность экстракции ДНК в образцах (*priority*) – *Normal*.
3. Создать новый протокол выделения ДНК и сохранить его. В

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

протоколе указать, что лизис и инкубация образцов происходит в приборе: ***On-board Lysis Buffer Dispensing – Yes, On-board Lysis Incubation – Yes.***

4. Перенести таблицу образцов в созданный протокол.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок, предназначенных для экстракции ДНК в приборе NucliSENS easyMAG, (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку на внутренние стенки по **10 мкл ВКО STI-87.**
6. В пробирки с **ВКО** внести по **100 мкл подготовленных проб**, используя наконечники с фильтром. (Следует избегать попадания в пробирку сгустков слизи и крупных частиц).
7. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **100 мкл ОКО.**
8. Загрузить пробирки с образцами в прибор, установить наконечники, запустить программу экстракции ДНК с лизисом образцов в приборе (***on board***).
9. Дождаться, пока автоматическая станция NucliSENS easyMAG не остановит работу в положении ***Instrument State – Idle.***
10. Ресуспендировать пробирку с **магнитной силикой NucliSens**, интенсивно перемешав на вортексе. Открыть крышку прибора, в каждую пробирку внести отдельным наконечником с фильтром по **25 мкл магнитной силики** и тщательно перемешать пипетированием. Магнитная силика должна быть равномерно распределена по всему объему пробирки.
11. Закрыть крышку прибора и продолжить программу экстракции ДНК.
12. После окончания экстракции ДНК, извлечь пробирки из прибора. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

При необходимости хранения очищенную ДНК следует перенести в стерильные пробирки не позднее 30 мин после выделения. Очищенная ДНК может храниться в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С, более длительно при температуре не выше минус 68 °С.

ТАБЛИЦА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Таблица приготовления реакционных смесей

Расчетная таблица приготовления реакционных смесей для проведения амплификации для комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	Объем реактивов на указанное количество реакций		
	10,00	5,00	0,50
Число реакций ⁸	ПЦР-смесь-1-FL-F, мкл	ПЦР-смесь-2-FRT, мкл	Полимераза (TaqF), мкл
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

⁸ Число исследуемых образцов, включая контроль этапа экстракции ДНК (N), контроли этапа ПЦР, с запасом на один образец (N+3+1).

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