

« УТВЕРЖДАЮ »

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко

« _____ » _____ 20 ____ г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления РНК энтеровирусов (*Enterovirus*)

в объектах окружающей среды и клиническом материале

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с

электрофоретической детекцией продуктов амплификации в

агарозном геле

«АмплиСенс® Enterovirus-EPh»

«СОГЛАСОВАНО»

И.О.директора ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича

Роспотребнадзора

А.А.Мовсисянц

« 9 » 12 2009 г.



ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
ПРИНЦИП МЕТОДА.....	3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	4
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	4
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА....	6
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК/РНК.....	6
СОСТАВ.....	7
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ	7
ЭКСТРАЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	7
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ.....	8
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ.....	8
А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР	8
Б. Проведение амплификации.....	8
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ.....	9
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	9
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.	10



ПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец
кДНК	- комплементарная ДНК
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОТ	- обратная транскрипция
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПКО	- положительный контрольный образец
СМЖ	- спинномозговая жидкость
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
EPh	- электрофоретическая детекция

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus-EPh*» предназначен для выявления РНК энтеровирусов (*Enterovirus*), выделенной из стерильных и нестерильных типов клинического материала (спинномозговая жидкость, отделяемое везикул, мазки из ротоглотки, образцы фекалий) в соответствии с показаниями представленными в МУ 3.1.1.2363-08 «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции», методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Выявление РНК энтеровирусов (*Enterovirus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с электрофоретической детекцией включает в себя следующие этапы: экстракция (выделение) РНК из образцов клинического материала, получение кДНК в ходе реакции обратной транскрипции, ПЦР-амплификация участка кДНК данного микроорганизма и электрофоретическая детекция. Экстракция РНК из клинического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО *Enterovirus-гес*), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами РНК проводится реакция обратной транскрипции, в ходе которой получают кДНК. Пробы кДНК используются для амплификации участка кДНК *Enterovirus* при помощи специфичных к этому участку ДНК праймеров и фермента Taq-полимеразы. Специфический продукт амплификации имеет определенный размер и детектируется методом электрофореза в агарозном геле.

74

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

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

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации кДНК Enterovirus. Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции (выделения) РНК, комплекты реагентов для проведения реакции обратной транскрипции и комплекты реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Комплект для выделения ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность
СМЖ	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	5х10 ³ ГЭ/мл.
СМЖ	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» варианты FEP и FRT	5х10 ³ ГЭ/мл.

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на следующих штаммах микроорганизмов: штаммы энтеровирусов (Coxsackie B1, B2, B3, B4, B5, B6; Polio (Sabin) I, II, III); вирусов гриппа А (H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H4N6, H11N6, H12N5, H3N8, H1N1, H6N2, H10N7, H5N1), В, риновирусов, RS вирусов, аденовирусов человека – 3, 5, 7, 37, 40 типов; штаммах *N meningitidis*, *St pneumoniae*, *H influenzae*, *Clebsiella* K 65 SW4, *Listeria monocitogenes* YCXЧ 19, *Listeria monocitogenes* YCXЧ 52, *Proteus vulgaris* 115/98, *Pseudomonas aeruginosa* ДН с1, *Staphilococcus aureus* 653, *Staphilococcus aureus* 29112, *Morganella Morganii* 619 с 01, *Enterobacter faecalis* 356.

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III – IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в 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 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».

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.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Спецификация по безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступна по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения РНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008) «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК.
3. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции «РЕВЕРТА-Л» (ТУ 9398-005-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
4. Дополнительные материалы и оборудование для проведения реакции обратной

5.10.20

транскрипции – согласно инструкции к комплекту реагентов для ОТ.

Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – «ЭФ» (ТУ 9398-070-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Дополнительные материалы и оборудование для электрофоретической детекции – согласно инструкции к комплекту реагентов для электрофоретической детекции.

Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

Центрифуга/вортекс.

Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).

Д. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл и от 50 до 1000 мкл).

1. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.

2. Штативы для микропробирок объемом 0,2 мл или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).

3. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.

14. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.1888-04.

15. Емкость для сброса наконечников.

16. Программируемый амплификатор (например, «GeneAmp PCR System 2400» («Applied Biosystems»), «Терцик» («ДНК-технология»), «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»), «Maxygene» («Axygen»), «Biometra», «MiniCycler», «PTC-100» («MJ Research» или аналогичные).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

Материалом для исследования служат стерильные и нестерильные типы клинического материала (спинномозговая жидкость, отделяемое везикул, мазки из ротоглотки, образцы фекалий) в соответствии с показаниями представленными в МУ 3.1.1.2363-08 «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции».

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК/РНК

Спинномозговая жидкость, отделяемое везикул, мазки из ротоглотки не требуют специальной подготовки для экстракции РНК.

6
И.Кол.

Подготовка образцов фекалий проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 – комплект реагентов для амплификации фрагмента кДНК энтеровирусов (*Enterovirus*) включает:

Реактив	Описание	Объём, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1 <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,275	1 пробирка
ПЦР-смесь-2 blue	Прозрачная жидкость синего цвета	0,6	1 пробирка
Воск для ПЦР	Твердое вещество белого цвета	1,7	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	2,0	1 флакон
ПКО кДНК <i>Enterovirus</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-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 (выделения) РНК:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО <i>Enterovirus-rec</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	5 пробирок

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ОТ-ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- Экстракция (выделение) РНК из исследуемых образцов.
- Проведение реакции обратной транскрипции.
- Проведение амплификации.
- Электрофоретическая детекция продуктов амплификации и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию РНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала («РИБО-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН

7
Зубов

ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО *Enterovirus-rec*).

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Реакцию обратной транскрипции провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для обратной транскрипции («РЕВЕРТА-L» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

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

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР

1. Пробирку с **воском для ПЦР** прогреть в термостате при температуре 95 °С до полного расплавления.
2. Раскапать на дно микропробирок для амплификации по **5 мкл ПЦР-смеси-1 *Enterovirus***. Сверху добавить по капле (примерно 10-15 мкл) расплавленного воска так, чтобы он полностью накрыл жидкость, закрыть крышки пробирок, подписать на каждой сокращенное название инфекции. Пробирки с разлитой **ПЦР-смесью-1 *Enterovirus*** и воском можно хранить при температуре от 2 до 8 °С.
3. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1 *Enterovirus*** для амплификации кДНК исследуемых и контрольных проб.
4. В пробирки с **ПЦР-смесью-1 *Enterovirus*** на поверхность застывшего воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2 blue**, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с **ПЦР-смесью-1 *Enterovirus***.
5. Сверху добавить каплю **минерального масла для ПЦР** (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл кДНК-проб**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК.
7. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль (К-) –** внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
 - б) **положительный контроль (К+) –** внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК *Enterovirus***.

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

Б. Проведение амплификации

1. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования (см. табл. 1).

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

Таблица 1

Программа амплификации кДНК *Enterovirus*

	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):						Амплификаторы с матричным регулированием температуры: «Biometra», «MiniCycler», «PTC-100» («MJ Research»)		
	«GeneAmp PCR System 2400» («Applied Biosystems»), «Терцик» («ДНК-технология»)			«GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»), «Maxygene» («Axygen»)					
икл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °С	пауза		95 °С	пауза		95 °С	пауза	
1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42	95 °С	1 мин	42
	58 °С	10 с		58 °С	25 с		58 °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	4 °С	хранение		4 °С	хранение		10 °С	хранение	

3. После окончания реакции пробирки отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР-амплификации (ЗОНУ 3). Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С (однако, перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ

Детекцию провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации («ЭФ» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерпретация результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной кДНК.

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов кДНК:

Enterovirus – 207 п.н.

ВКО *Enterovirus-rec* – 440 п.н.

Принцип интерпретации следующий:

- Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне 207 п.н. большей или меньшей интенсивности,

независимо от наличия полосы внутреннего контроля. Полоса внутреннего контроля может отсутствовать в пробах с высокой концентрацией РНК *Enterovirus*.

- **Отрицательными** считаются образцы, которые содержат только полосу **440 п.н.** большей или меньшей интенсивности.

Кроме полос **207 п.н.** и **440 п.н.** в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения РНК, в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Специфическая полоса на электрофореграмме	
		207 п.н.	440 п.н.
ОК	Выделение (экстракция) РНК	Нет	Есть
К-	ПЦР	Нет	Нет
К+	ПЦР	Есть	Нет

ВНИМАНИЕ!

1. Если в дорожке положительного контроля ПЦР (К+) отсутствует специфический продукт **207 п.н.** необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена кДНК *Enterovirus*.
2. Если в дорожке отрицательного контроля экстракции ДНК (В-) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) присутствует специфический продукт **207 п.н.** необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК *Enterovirus*, начиная с этапа выделения (экстракции) РНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

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

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут.

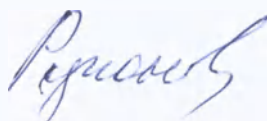
Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus*-EPh»

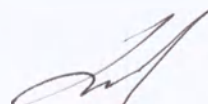
направлять в адрес ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (499) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора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

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Руководитель Государственных испытаний



Г.М.Игнатьев

Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора