

УТВЕРЖДАЮ

Кутырев В.В.

2007 г.

**по применению Тест-системы для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом
полимеразной цепной реакции
(ГенПест)**

Тест-система предназначена для выявления ДНК *Yersinia pestis* в клиническом материале, органах животных и объектах внешней среды методом ППР.

Метод основан на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР), представляющей собой повторяющиеся циклы синтеза - амплификацию специфической области ДНК-мишени в присутствии ДНК-полимеразы, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буферного раствора и олигонуклеотидных праймеров, распознающих ДНК-мишень.

Принцип метода: обнаружение полосы свечения ДНК после электрофореза при визуализации агарозного геля в проходящем ультрафиолете.

Объектом для исследования может быть клинический материал, объекты внешней среды, органы животных, а также микробные взвеси при идентификации выделенных культур. При работе с клиническим материалом и загрязненными объектами внешней среды необходим предварительный этап подготовки проб (выделение ДНК). Подготовку

проб осуществляют с помощью поставляемого отдельно набора и прилагаемой к нему инструкции.

2. ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Состав

Тест-система для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции представляет собой набор следующих компонентов:

- 1-2. Праймеры F21 и F22 – водные растворы двух олигонуклеотидных праймеров, синтезированных в автоматическом ген-синтезаторе ДНК. Прозрачные бесцветные жидкости.
- 3-4. Праймеры PlaY1 и PlaY2 – водные растворы двух олигонуклеотидных праймеров, синтезированных в автоматическом ген-синтезаторе ДНК. Прозрачные бесцветные жидкости.
5. Таq-полимераза – термостабильная ДНК-полимераза в буферном растворе, рекомбинантная. Прозрачная бесцветная жидкость.
6. дНТФ – водный раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Прозрачная бесцветная жидкость.
7. ДНК (положительный контроль) – водный раствор ДНК *Y. pestis EV* линии НИИЭГ. Прозрачная бесцветная жидкость.
8. 10хБ – 10-кратный буферный раствор. Прозрачная бесцветная жидкость.
9. MgCl₂ - 1 % раствор магния хлорида. Прозрачная бесцветная жидкость.
10. Н₂О – вода бидистиллированная. Прозрачная бесцветная жидкость.
11. Масло – масло вазелиновое стерильное. Прозрачная бесцветная жидкость.

Тест-система рассчитана на проведение 100 определений.

Аналитические характеристики

Праймеры F21 и F22, обеспечивают специфичную амплификацию фрагмента ДНК размером 306 п.н., соответствующего нуклеотидной последовательности структурного гена *cafI*, ответственного за синтез капсульного антигена и локализованного на плазмиде чумного микроба pFra. Праймеры PlaY1 и PlaY2, обеспечивают специфичную амплификацию фрагмента ДНК размером 480 п.н., соответствующего нуклеотидной последовательности структурного гена *pla*, ответственного за синтез активатора плазминогена и локализованного на плазмиде чумного микроба pPst.

Тест-система выявляет в ПЦР 1×10^3 м.к./мл *Y. pestis*, обладающих генами *cafI* (плазида pFra) и *pla* (плазида pPst).

Оборудование и реагенты

1. Амплификатор;
2. Дозаторы переменного объема;
3. Наконечники к микродозаторам;
4. Микропробирки объемом 0,6 мл;
5. Микропробирки объемом 1,5 мл;
6. Центрифуга для микропробирок до 12000 об/мин;
7. Твердотельный термостат;
8. Набор для выделения ДНК;
9. Набор для электрофореза.

Форма выпуска

В полипропиленовых микропробирках объемом 1,5 мл и 0,6 мл:

Перечень компонентов	Объем (мл)	Кол-во (шт.)
Праймер F21	0,1	1
Праймер F22	0,1	1
Праймер PlaY1	0,1	1
Праймер PlaY2	0,1	1
Тaq-полимераза	0,02	1
дНТФ	0,25	1
ДНК	0,25	1
10×Б	0,25	1
MgCl ₂	0,1	1
H ₂ O	1,2	1
Масло	1,5	2

Тест-систему упаковывают в полиэтиленовый мешок с застежкой 7×10 см. В мешок вкладывают Инструкцию по применению.

3. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказаний к применению не зарегистрировано.

4. ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ ИЗДЕЛИЯ

Подготовка проб из клинического материала и объектов внешней среды

При анализе крови к образцу объемом 1 мл немедленно после забора добавляют 1/10 объема натрия цитрата раствора 4 % и осторожно перемешивают.

Кусочки органов в количестве 1 г растирают в ступке с 0,5-1,0 г стеклянного порошка, добавляют 1-2 мл натрия хлорида раствора 0,9 %. Надосадочную жидкость отбирают через ватный тампон в отдельные пробирки.

Почву в количестве 10 г тщательно перемешивают с 50 мл раствором натрия хлорида раствора 0,9 % и отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость переносят в центрифужные пробирки, центрифугируют при 8000 g в течение 10 мин. Осадок суспендируют в 1 мл натрия хлорида растворе 0,9 %.

Смывы с поверхностей берут с помощью стерильного ватного тампона во флакон с 50 мл натрия хлорида раствора 0,9 %. Центрифугируют при 8000 g 20 мин. Осадок ресуспендируют в 1 мл натрия хлорида растворе 0,9 %.

Обеззараживание

К подготовленным пробам добавляют мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01%) и прогревают при температуре $(56 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

Выделение ДНК

Получение ДНК из обеззараженного клинического материала и объектов внешней среды осуществляют с помощью набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией. Выделенную ДНК в объеме 10 мкл используют для ПЦР.

Подготовка проб из чистых культур микроорганизмов

Для исследования чистых культур микроорганизмов готовят бактериальную взвесь клеток, выросших на плотной питательной среде в 2 мл натрия хлорида раствора 0,9 % по стандартному образцу мутности 10 единиц ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (ОСО 42-28-85П), соответствующего года выпуска, что эквивалентно 1×10^9 м.к. возбудителя чумы в 1 мл. Затем взвесь разводят натрия хлорида раствором 0,9 % до концентрации 1×10^7 м.к./мл и обеззараживают добавлением мертиолята натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01%) и прогреванием при $56 ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Затем 1 мл обеззараженной взвеси переносят в микропробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл и центрифугируют при 8000 g в течение 15 мин. Осадок ресуспендируют в 50 мкл стерильной бидистиллированной воды, прогревают на кипящей водяной бане в

течение 10 мин и центрифугируют при 8000 g в течение 1-2 мин. Супернатант в объеме 10 мкл используют для ПЦР.

5. ПОРЯДОК РАБОТЫ ИЗДЕЛИЯ

Реактивы для проведения ПЦР извлекают из холодильника и полностью размораживают при комнатной температуре. Для проведения амплификации ДНК готовят микропробирки объемом 0,6 мл в соответствии с количеством образцов. Все реакционные компоненты добавляют отдельными наконечниками с помощью дозаторов переменного объема: 0,5-10, 5-40 и 40-200 мкл. В отдельной микропробирке объемом 0,6 мл готовят смесь компонентов из расчета на одну пробу в следующей последовательности: H_2O – 4,8 мкл; $10\times B$ – 2,5 мкл; дНТФ – 2,5 мкл; $MgCl_2$ – 1 мкл, праймер F21 – 1 мкл, праймер F22 – 1 мкл, праймер PlaY1 – 1 мкл, праймер PlaY2 – 1 мкл, Taq-полимераза – 0,2 мкл.

Смесь перемешивают пипетированием и вносят по 15 мкл в заранее маркированные микропробирки. Затем наслаивают по 30 мкл масла и вносят: 10 мкл бидистиллированной воды (в отрицательный контроль), 10 мкл ДНК (положительный контроль), а в остальные - по 10 мкл проб.

Общий (конечный) объем во всех пробирках должен составлять 25 мкл.

Микропробирки помещают в амплификатор и проводят полимеразную цепную реакцию. Перед началом амплификации пробы денатурируют при $(94\pm 0,1)^\circ C$ в течение 3 мин. Затем проводят 35 циклов. Каждый цикл амплификации включает в себя денатурацию ДНК при температуре $(94\pm 0,1)^\circ C$ в течение 40 сек, отжиг праймеров при температуре $(58\pm 0,1)^\circ C$ в течение 40 сек, синтез комплементарной цепи при температуре $(72\pm 0,1)^\circ C$ в течение 40 сек. После последнего цикла пробы прогревают в течение 3 мин при температуре $(72\pm 0,1)^\circ C$.

К продуктам амплификации, находящимся в микропробирках после термоциклирования, с помощью микропипетки добавляют по 4 мкл буферного раствора для нанесения проб, перемешивают пипетированием и по 15 мкл переносят в лунки геля. Затем закрывают крышку аппарата, подсоединяют блок питания, включают его и проводят электрофорез.

Электрофорез проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора в течение 30 - 40 мин, при градиенте напряжения 10 В/см до прохождения лидирующего красителя 2/3 длины трека.

Внимание! С гелем агарозы следует работать в перчатках, поскольку этидиум бромид является мутагеном.

Оценка результатов ПЦР

По окончании электрофореза агарозный гель извлекают из камеры и помещают на 10 мин в ванночку с раствором этидиум бромида в концентрации 0,5 мкг/мл для окрашивания ПЦР-продуктов.

Результат проведения ПЦР регистрируют и документируют в проходящем ультрафиолете с использованием документирующей видеосистемы или зеркального фотоаппарата с пленкой типа "Микрат" 300.

Результаты оценивают по наличию фрагментов ДНК, полосы которых располагаются на том же уровне в геле, что и полосы в положительном контроле с препаратом ДНК. Для возбудителя чумы, содержащего геномы *cafI* (плазмида *pFga*) и *pla* (плазмида *pPst*), выявляются полосы 306 н.п. и 480 н.п.

Отрицательный контроль: полоса на уровне положительного контроля должна отсутствовать; наличие полосы свидетельствует о контаминации компонентов тест-системы.

Наличие полос, располагающихся выше или ниже контрольной, является неспецифичным ответом и во внимание не принимается.

6. ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Срок годности - 6 мес. Препарат с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Хранят в соответствии с санитарными правилами СП 3.3.2.1248-03 при температуре от минус 18 °С и ниже.

Транспортируют в соответствии с санитарными правилами СП 3.3.2.1248-03 не более трех суток при температуре от 2 °С до 8 °С и в термосе со льдом.

Меры предосторожности

ПЦР-анализ выполняется в соответствии с санитарными правилами, СП 1.3.1285-03 «Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Москва, 2003; "Методическими указаниями по детекции патогенной микрофлоры в клиническом материале, пищевых продуктах, объектах внешней среды и выполнением генетической идентификации клеток с помощью полимеразной цепной реакции", Москва, 1996 и "Методическими указаниями по обеззараживанию биологического материала и объектов

внешней среды, зараженных бактериями I-IV групп патогенности, при исследованиях методом ПЦР", Саратов, 2001.

Рекламации на качество тест-системы ГенПест в течение срока годности следует направлять в ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора: 119002, Россия, г. Москва, пер. Сивцев-Вражек, 41, тел (495)241-39-22 факс (495)241-92-38 и на предприятие-изготовитель: 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46, ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, тел.(845-2)26-21-31, факс (845-2)51-52-12.

Заместитель директора
по научной и производственной
работе ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора



Никифоров А.К.

Директор ФГУН
ГИСК им. Л.А. Тарасевича
Роспотребнадзора

Медуницын Н.В.