

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

Г.Г. Опищенко

« » 2007 г.

№

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

«АмплиСенс® *Shigella* sp. и *EIEC*»

г-системы для выявления ДНК микроорганизмов рода *Shigella* и инвазивных *E.coli* в объектах окружающей среды и клиническом методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической продукцией амплификации в агарозном геле, набор диагностический включает три комплекта реагентов: «ДНК-сорб-В» вариант 50, «ЭФ» вариант 50 или «АмплиСенс» вариант 50-R, и «ЭФ» вариант 200.

«ДНК-сорб-В» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического

«АмплиСенс» вариант 50 или «АмплиСенс» вариант 50-R – комплект реагентов для выделения ДНК микроорганизмов рода *Shigella* и энтероинвазивных *E.coli*;

«ЭФ» вариант 200 – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле.

УСКА.

«ДНК-сорб-В» вариант 50 включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Буферный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон
Смывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон
Смывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка
Элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

используется на выделение ДНК из 50 проб, включая контрольные образцы.

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича

Роспотребнадзора

Н.В.Медуницын

« 28 »

2007 г.



ния реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в комнату продуктов ПЦР (**ЗОНУ 3**). Пробы после амплификации можно хранить 16 часов при комнатной температуре, в течение недели при температуре от 2 до 8 °C (однако, с началом электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры (такого же воска)).

Продукты амплификации проводятся разделением фрагментов ДНК в агарозном

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК

ЗОНЕ 3 - помещении для анализа продуктов амплификации).

РАБОТА С АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК ДОЛЖНА ПРОВОДИТЬСЯ В ОТДЕЛЬНОЙ КОМНАТЕ СОТРУДНИКОМ ЛАБОРАТОРИИ, НЕ ПРОИЗВОДЯЩИМ МАНИПУЛЯЦИЙ В ЗОНЕ 1 И ЗОНЕ 2.

е рабочих растворов и агарозного геля.

рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить **25 мл Трис-буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия**, довести дистиллированной до **500 мл**, закрыть цилиндр парафином и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Этидия бромид – канцерогенное соединение, поэтому при работе с ним соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующим раствором.

Растворы, содержащие этидия бромид, перед утилизацией следует подвергать дезинфекции (см. раздел «Обеззараживание»).

Для электрофореза из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** готового рабочего буфера, перемешать, затем нагреть в микроволновой печи (или на электроплитке) до полного растворения

агарозы. Если используется электроплитка, содержимое колбы необходимо периодически перемешивать палочкой, чтобы предотвратить пригорание агарозы, после этого довести до кипения еще два раза и остудить, вращая колбу, до температуры 65-70 °C.

После приготовления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности на 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время приготовления увеличивается до 5 мин. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Достать из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-

б столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры, установить, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее 3 см друг от друга.

еля должна быть около 6 мм.

ного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из лунки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду. ДНК, соответственно, движется к положительному. Залить в камеру готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 1 см.

ПРОВОДЯЩИЕ ЭЛЕКТРОДЫ.

с продуктами амплификации последовательно выставить в штатив, отобрать из-под стекла по **10–15 мкл пробы** и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из флакона после нанесения каждой пробы). В **каждом** ряду лунок геля должен быть обязательно представлен **K+** и, желательно, маркер молекулярных масс.

Положить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. Если нет нарушения контактов, то при прохождении тока от электродов должны подниматься пузырьки. Оптимальное напряжение электрического поля 10 В/см. При использовании камеры SE-2 («Хеликон») и источника «Эльф-4» («ДНК-технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, регулировка по напряжению, время электрофореза – 18-20 минут.

После того как гель пройдет примерно половину длины геля (не менее 1,5 см), выключить источник, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отсканировать нанесение проб, занести в базу данных.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены стеклянной пластиной!

ОБОРУДОВАНИЕ.

Анализ результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК (см. табл. 2 и рис.1).

Анализ амплифицированных специфических фрагментов ДНК:

Анализ микроорганизмов *Shigella species* и *EIEC* – 400 п.н.

Анализ контрольного образца – 800 п.н.

Оценка результатов анализа контрольных точек.

1	Какой этап ПЦР-анализа контролируется	Специфические полосы на электрофореграмме	
		Полоса 400 п.н.	Полоса 800 п.н.
	Выделение ДНК	Есть	Есть
	Выделение ДНК	Нет	Есть
	ПЦР	Нет	Нет
	ПЦР	Есть	Нет

ке, соответствующей отрицательному контролю этапа выделения (ОК), долж- только полоса внутреннего контроля на уровне **800 п.н.**

ке положительного контроля этапа ПЦР (К+) должна быть только полоса поло- ого контрольного образца – **400 п.н.**, и должна отсутствовать полоса внутреннего образца **800 п.н.**

ке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К–), не должно таких полос, за исключением праймер-димеров, находящихся ниже уровня 100 п.н. гельными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся по- ровне **400 п.н.** большей или меньшей интенсивности независимо от наличия поло- ненного контрольного образца. Полоса внутреннего контрольного образца может вать в пробах с высокой концентрацией ДНК *Shigella sp.*

ельными считаются образцы, которые содержат только полосу **800 п.н.** большей шей интенсивности и не содержат полосу **400 п.н.**

лос **400 п.н.** и **800 п.н.** в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

т анализа не подлежат учету в следующих случаях:

льтаты анализа контрольных точек не совпадают с приведенными в таблице 2, то гвующий этап анализа следует переделать.

рожке какой-либо из исследуемых проб отсутствуют обе полосы, и **400 п.н.** и **800** лтат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повто- редование этой клинической пробы с самого начала. Возможная причина: ошибка в е подготовки клинического материала, приведшая к потере ДНК или ингибирова- ах появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: те «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификато-

и тщательном контроле (ОК, К-) выявляется специфическая полоса **400 п.н.**, зна-
гошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа счи-
действительными. Требуется повторить анализ проб с самого начала, а также
еры по выявлению источника контаминации.

КИВАННИЕ.

ивание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно,
одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) в специальные кон-
содержащие дезинфицирующий 0.2 % РАСТВОР ДП-2Г.

нные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно
ающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и за-
ем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной
уре на 4-6 часов. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно пере-
т. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию. Отработанный буфер
зактивировать с помощью стеклянной колонки емкостью на 1-2 л, заполненной
ванным углем. Отработанный буфер пропускать через нее небольшими порция-
тивированный раствор можно сливать в канализацию.

НОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

ти. 6 месяцев. Тест-система с истекшим сроком годности применению не подле-

рование. В соответствии с СП 3.3.2.1248-03; при температуре от 2 до 8 °С не бо-

соответствии с СП 3.3.2.1248-03; «ДНК-сорб-В» вариант 50 (кроме ВКО *Shigella*
и температуре от 2 до 25 °С. «АмплиСенс» вариант 50 и «АмплиСенс» вариант
shigella и ОКО - при температуре от 2 до 8 °С. «ЭФ» вариант 200 - при температу-
5 °С в защищённом от света месте. При хранении разукomплектовать!

пуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учрежде-

ии на качество тест-системы «АмплиСенс® *Shigella sp. и EIEC*» направлять в
К им. Л.А. Тарасевича (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (095)
акс (095) 241-92-38), а также на предприятие-изготовитель: ФГУН «ЦНИИ эпиде-

ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»
надзора



В.И. Покровский

ель Государственных испытаний
торией биохимии и биотехнологии
Ж им.Тарасевича Роспотребнадзора

Р.А. Волкова