

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по
эпидемиологии - Врио директора
Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный
научно-исследовательский
институт эпидемиологии»
Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека (ФБУН
ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора)

В.Г. Акимкин
«22» 01 2018 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Neisseria gonorrhoeae* в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
электрофоретической детекцией продуктов амплификации
в агарозном геле

«АмплиСенс® *Neisseria gonorrhoeae*-EPh»

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ

Набор реагентов выпускается в 5 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант 100 R (пробирки 0,5 мл), «ЭФ» вариант 200.

Форма 2 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100, «ПЦР-комплект» вариант 100 R (пробирки 0,2 мл), «ЭФ» вариант 200.

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100 R (пробирки 0,5 мл).

Форма 4 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100 R (пробирки 0,2 мл).

Форма 5 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 200.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формами **3, 4 и 5** гарантируются только в случае применения дополнительных комплектов реагентов «ДНК-сорб-АМ» и «ЭФ» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

В настоящей инструкции применяются следующие термины и сокращения:

ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
ВКО	– Внутренний контрольный образец
ВКО-FL	– Внутренний контрольный образец для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
ПКО	– Положительный контрольный образец
ОКО	– Отрицательный контрольный образец
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

СОСТАВ

Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 100 (ТУ 9398-036-01897593-2009) – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная жидкость от бесцветного до желтого или розового цвета ¹	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия от белого до темно-бежевого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

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

Дополнительно к комплекту реагентов «ДНК-сорб-АМ» прилагаются следующие реактивы:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Транспортная среда для мазков	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
ВКО комплексный ²	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ВКО-FL ³	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение ДНК из 100 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100 R или вариант 200 – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Neisseria gonorrhoeae* включает:

Реактив	Описание	«ПЦР-комплект» вариант 100-R		«ПЦР-комплект» вариант 200	
		Объем (мл)	Кол-во	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 1	Прозрачная бесцветная жидкость	---	---	0,8	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-R <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 1 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,005	80 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл	---	---
ПЦР-смесь-1 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 2	Прозрачная бесцветная жидкость	---	---	0,3	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-R <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 2 раскапана под воск	Прозрачная бесцветная жидкость	0,005	30 пробирок объемом 0,5 или 0,2 мл	---	---
ПЦР-смесь-2 blue	Прозрачная жидкость синего цвета	1,2	1 пробирка	1,2	2 пробирки
Воск для ПЦР	Твердое вещество белого цвета	---	---	1,7	2 пробирки
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон	8,0	1 флакон
ПКО ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов вариант 100 R рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контроли.

Комплект реагентов вариант 200 рассчитан на проведение 220 реакций амплификации, включая контроли.

² Препарат ВКО комплексный используется для выделения ДНК при работе с наборами с электрофоретической детекцией.

³ Препарат ВКО-FL используется для выделения ДНК при работе с наборами с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Комплект реагентов «ЭФ» вариант 200 – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл), Масса (г)</i>	<i>Кол-во</i>
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	50 мл	1 флакон
Агароза для электрофореза ДНК	Порошок белого цвета	1,7 г	2 флакона

Комплект реагентов рассчитан на электрофоретический анализ 240 образцов (из расчета 100 мл геля – 5 рядов по 24 лунки).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Neisseria gonorrhoeae*-EPh» предназначен для выявления ДНК *Neisseria gonorrhoeae* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала, проведения ПЦР-амплификации и детекции продуктов ПЦР-амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Формы комплектации 3, 4, 5 предназначены для проведения ПЦР-амплификации. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ», «ДНК-сорб-В» для выделения ДНК из клинического материала и комплект реагентов «ЭФ» для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ ПРОБ

Процедура забора клинического материала описана в методических рекомендациях «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 2012 г.

Для исследования используется следующий клинический материал: соскобы (мазки) со слизистых оболочек урогенитального тракта, мазки с конъюнктивы, осадок клеток первой порции утренней мочи.

Условия хранения проб (клинического материала в транспортной среде для мазков):

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 нед;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 мес;

- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Условия хранения образцов мочи:

- при комнатной температуре – в течение 1 сут;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 нед;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 2 мес;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Предобработка образцов мочи.

Взбалтывают флакон с мочой. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин при 10 тыс g (12 тыс об/мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, Германия). Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удаляют надосадочную жидкость, не захватывая осадок.

К осадку добавляют транспортную среду до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Хранение осадка клеток первой порции утренней мочи, секрета предстательной железы:

- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 сут;
- при температуре не выше минус 16 °С – в течение 1 нед;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание клинического материала.

Транспортирование проб осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом: при температуре от 2 до 8 °С – в течение 5 сут, в замороженном виде – в течение 1 сут.

Примечание. Материалом для исследования может служить секрет предстательной железы. В этом случае для выделения ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, 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 необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- 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, 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 трех отдельных помещениях (зонах). Запрещается перемещение персонала из помещения для электрофореза в другие рабочие помещения лаборатории. Смена рабочей верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза. Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зонах Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты (включая буфер и гели), упаковку⁴ биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять 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.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для

⁴ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

автоматических дозаторов с фильтром⁵. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- При работе с включенным трансиллюминатором пользоваться защитным экраном или защитной маской.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.
- При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.
- Листы безопасности реагентов (SDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

⁵ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции с помощью вакуумного отсасывателя используются одноразовые наконечники без фильтра.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, не включающих комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ», «ЭФ»)

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека (для форм комплектации, включающих комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ», «ЭФ»)

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения ДНК из проб требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся

микропробирки на 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

8. Штативы для микропробирок на 1,5 мл и наконечников (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения ПЦР-амплификации требуются:

1. Амплификатор для микропробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия или эквивалентный), для микропробирок 0,2 мл (например, «Gradient Palm Cycler», «Corbett Research», Австралия или эквивалентный).
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
4. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
5. Набор электронных или механических дозаторов переменного (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 (0,2) мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Штативы для наконечников и микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
10. Отдельный халат и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.

ЗОНА 3.

Для детекции продуктов ПЦР-амплификации методом электрофореза в агарозном геле требуются:

1. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл (например, «SE-2», «Хеликон», Россия).
2. Источник постоянного тока с напряжением 150 – 460 В (например, «Эльф-4», «ДНК-Технология», Россия).
3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например, «Биоком», Россия).
4. Гель-документирующая система GelDoc-It (например, UVP, LLC. («ЮВиПи, ЛЛС»), США).
5. Аквадистиллятор.
6. Холодильник от 2 до 8 °С.
7. Микроволновая печь для плавления агарозы.
8. Колба коническая из термостойкого стекла (ГОСТ 21400-75) для плавления агарозы на 250 мл.
9. Мерный цилиндр на 1 л (ГОСТ 1770-74).
10. Штатив для микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
11. Отдельный механический или электронный дозатор объемом 10-40 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
12. Одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
13. Пластиковая ёмкость на 5 л для сбора буфера и гелей, содержащих бромид этидия.
14. Отдельный халат и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
15. Емкость для сброса наконечников.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки проб).

Объем пробы (клинического материала в транспортной среде для мазков), необходимый для выделения ДНК, – 0,1 мл.

Порядок работы.

1. Лизирующий раствор (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть, перемешивая при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Добавление реагентов.

Способ 1

- отобрать необходимое количество одноразовых пробирок **1,5 мл** (включая отрицательный контроль выделения) и, используя наконечник с аэрозольным барьером, внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО комплексного**.
- ресуспендировать **сорбент универсальный** до гомогенной консистенции, внести в каждую пробирку по **20 мкл сорбента универсального** и по **300 мкл лизирующего раствора**, используя наконечники с аэрозольным барьером. Промаркировать пробирки.

Способ 2

- перед началом работы во флакон с лизирующим раствором добавить весь объем (2 мл на 30 мл лизирующего раствора) предварительно гомогенизированного сорбента универсального и необходимый объем (1 мл на 30 мл лизирующего раствора) **ВКО комплексного** и перемешать. Допускается хранение полученной смеси в течение 2 сут при комнатной температуре. Перед применением тщательно перемешать.
 - отобрать необходимое количество одноразовых пробирок **1,5 мл** (включая отрицательный контроль выделения) и, используя наконечник с аэрозольным барьером, внести в каждую пробирку по **320 мкл** подготовленной смеси **лизирующего раствора, сорбента универсального и ВКО комплексного**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки согласно маркировке внести по **100 мкл** пробы, используя для каждой пробы отдельный наконечник с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля выделения внести **100 мкл ОКО**, используя наконечник с аэрозольным барьером.
 4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и инкубировать **5 мин** при температуре **65 °С** в термостате. После окончания инкубации перемешать на вортексе и поставить в штатив на **2 мин**.
 5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при **10 тыс об/мин** в течение **30 с**. Не захватывая сорбент универсальный, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без аэрозольного барьера.
 6. Добавить в пробы по **1 мл отмывочного раствора**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального.
 7. Повторить п. 5.
 8. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С** на **5-10 мин** для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
 9. В пробирки добавить по **100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Поместить в термостат с

температурой 65 °С на 5 мин.

10. Перемешать на вортексе. Центрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (ДНК-проба). Указанный материал готов к постановке ПЦР.

ДНК-пробы можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

Пробирки с ДНК-пробами переносят в зону ПЦР-амплификации.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при установке пробирок в амплификатор, нагретый до 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Для выявления ДНК *Neisseria gonorrhoeae* используются две пары праймеров:

- *Neisseria gonorrhoeae* 1 – для ПЦР-амплификации ДНК криптической плазмиды (395 п.н.);
- *Neisseria gonorrhoeae* 2 – для ПЦР-амплификации гена аминокислотилтрансферазы (450 п.н.).

Анализ осуществляется в два этапа. Сначала проводится амплификация с парой праймеров *Neisseria gonorrhoeae* 1, в качестве скринирующего теста. Затем с ДНК-пробами, давшими положительный результат с парой *Neisseria gonorrhoeae* 1, проводится амплификация с парой праймеров *Neisseria gonorrhoeae* 2, в качестве подтверждающего теста.

Положительными на наличие ДНК *Neisseria gonorrhoeae* считаются образцы, которые дали положительный результат в обеих реакциях. Если положительный результат детектируется только в одной реакции, то в образце присутствует *Neisseria* другого вида.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

При использовании комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100 R пункты 1 и 2 выполнять не нужно.

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 *Neisseria gonorrhoeae* 1. 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 *Neisseria gonorrhoeae* 1 и воском можно хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 нед.
- Отобрать необходимое количество подготовленных в п. 2 пробирок, или пробирок с ПЦР-смесью-1-R *Neisseria gonorrhoeae* 1, для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
 - На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-смеси-2 blue, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с содержимым пробирки под воском.
 - Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл). При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой, минеральное масло можно не добавлять.
 - Приготовить пробирки с ПЦР-смесью-1 *Neisseria gonorrhoeae* 2 так, как описано в п.п. 1-5.

Б. Проведение амплификации.

- Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольными барьерами, внести по 10 мкл ДНК-проб, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК (ОКО).
- Поставить контрольные реакции амплификации:
 - отрицательный контроль (К-) – вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера;
 - положительный контроль (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *Neisseria gonorrhoeae*.
- Запустить на амплификаторе программу (см. табл. 1). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С, поставить программу на паузу, поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

Таблица 1.

Программа амплификации ДНК *Neisseria gonorrhoeae*

	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):						Амплификаторы с матричным регулированием температуры: «Biometra», «MiniCycler», «PTC-100» («MJ Research»)		
	«Терцик» («ДНК-Технология»)			«GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»)					
цикл	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	15 с	42	95 °С	1 мин	42
	65 °С	10 с		65 °С	25 с		65 °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	

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

Время амплификации на амплификаторе с регулированием температур по матрице примерно 2 ч 30 мин, на амплификаторе с активным регулированием – 1 ч 50 мин.

4. После окончания реакции собрать пробирки в штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР-амплификации (**ЗОНУ 3**).

Образцы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 16 °С (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

ЭТАП 3. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ.

(проводится в ЗОНЕ 3 - помещении для детекции продуктов ПЦР-амплификации).

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

Приготовление рабочих растворов и агарозного геля.

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

ВНИМАНИЕ! Бромид этидия – соединение, обладающее репродуктивной и острой токсичностью, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

2. **Агарозу для электрофореза ДНК** из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в

микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70 °С.

3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры для горизонтального электрофореза. Толщина геля должна быть около 0,6 см. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее **5 см** друг от друга.
4. После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду (ДНК будет двигаться к положительному). Залить в камеру для горизонтального электрофореза готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Порядок работы.

1. Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из-под слоя масла 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 камеры после нанесения каждого образца). В **каждом** ряду лунок геля должен быть обязательно представлен **K+** и, желательно, маркер молекулярных масс (с набором не поставляется).
2. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. Оптимальное напряжение электрического поля 10 В/см. При использовании камеры «SE-2» («Хеликон») и источника питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18-20 мин.
3. Когда краситель пройдет примерно половину длины геля (не менее 1,5 см), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отмечая порядок нанесения проб, занести в базу данных.

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

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК (см. табл. 2 и 3).

Положительными на наличие ДНК *Neisseria gonorrhoeae* считаются образцы, которые дали положительный результат на наличие ДНК криптоической плазмиды и гена аминоксидилтрансферазы (с ПЦР-смесью-1 *Neisseria gonorrhoeae* 1 и ПЦР-смесью-1 *Neisseria gonorrhoeae* 2).

А. Учет результатов при идентификации ДНК криптоической плазмиды (ПЦР-смесь-1 *Neisseria gonorrhoeae* 1).

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК:

криптоическая плазида *Neisseria gonorrhoeae* – 395 п.н.

ВКО комплексный – 660 п.н.

Аналитическая чувствительность набора реагентов – не менее 5×10^3 ГЭ в мл клинической пробы.

Таблица 2.

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Специфическая полоса на электрофореграмме	
		полоса 395 п.н.	полоса 660 п.н.
«ОК»	Выделение ДНК	Нет	Есть
«К-»	ПЦР	Нет	Нет
«К+»	ПЦР	Есть	Нет

- 1. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа выделения (ОК), должна быть только полоса внутреннего контроля на уровне 660 п.н.**
- 2. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа ПЦР (К+), должна быть полоса положительного контроля – 395 п.н., полоса внутреннего контроля 660 п.н. должна отсутствовать. Возможно присутствие полос праймер-димеров, находящихся ниже уровня 100 п.н.**
- 3. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К–), не должно быть никаких полос, за исключением возможных праймер-димеров, находящихся ниже уровня 100 п.н.**
- 4. Положительными на наличие ДНК криптоической плазмиды *Neisseria gonorrhoeae* считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне 395 п.н. большей или меньшей интенсивности независимо от наличия полосы внутреннего контроля. Полоса внутреннего контроля может отсутствовать в пробах с высокой концентрацией ДНК криптоической плазмиды *Neisseria gonorrhoeae*.**
- 5. Отрицательными на наличие ДНК криптоической плазмиды *Neisseria gonorrhoeae* считаются образцы, которые содержат только полосу 660 п.н. большей или меньшей интенсивности и не содержат полосу 395 п.н.**
- 6. Кроме полос 395 п.н. и 660 п.н. в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.**

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если результаты анализа контрольных точек не совпадают с приведенными в табл. 2, то соответствующий этап анализа следует переделать.
2. Если в дорожке какой-либо из исследуемых проб отсутствуют обе полосы, и **395 п.н.** и **660 п.н.** Результат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повторить исследование этой пробы с этапа выделения ДНК. Возможная причина: ошибка в процедуре подготовки исследуемого материала, приведшая к потере ДНК или ингибированию ПЦР.
3. В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.
4. Если в отрицательном контроле (ОК, К-) выявляется специфическая полоса **395 п. н.**, значит, произошла контаминация реактивов или образцов. Результаты анализа считают недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Б. Учет результатов при идентификации ДНК гена аминокетилтрансферазы (ПЦР-смесь-1 *Neisseria gonorrhoeae* 2).

Длина специфической полосы амплифицированного фрагмента ДНК:
ген аминокетилтрансферазы *Neisseria gonorrhoeae* – 450 п.н.

Таблица 3.

Результаты постановки контролей различных этапов ПЦР-анализа

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Специфическая полоса 450 п.н. на электрофореграмме
«ОК»	Выделение ДНК	Нет
«К-»	ПЦР	Нет
«К+»	ПЦР	Есть

1. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа ПЦР (К+) должна быть только полоса положительного контроля – 450 п.н.
2. В дорожках, соответствующих отрицательному контролю этапа выделения (ОК) и отрицательному контролю этапа ПЦР (К–), не должно быть никаких полос, за исключением возможных праймер-димеров, находящихся ниже уровня 100 п.н.
3. Положительными на наличие ДНК гена аминокетилтрансферазы *Neisseria gonorrhoeae* считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне 450 п.н. большей или меньшей интенсивности.
4. Отрицательными на наличие ДНК гена аминокетилтрансферазы *Neisseria gonorrhoeae* считаются образцы, которые не содержат полосу 450 п.н.
5. Кроме полосы 450 п.н. в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы

праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если результаты анализа контрольных точек не совпадают с приведенными в табл. 3, то соответствующий этап анализа следует переделать.
2. В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.
3. Если в отрицательном контроле (ОК, К-) выявляется специфическая полоса **450 п.н.**, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб с этапа выделения ДНК, а также принять меры по выявлению источника контаминации.

Положительными на наличие ДНК *Neisseria gonorrhoeae* считаются образцы, которые дали положительный результат на наличие ДНК криптоической плазмиды и гена аминоксидилтрансферазы (с ПЦР-смесью-1 *Neisseria gonorrhoeae* 1 и ПЦР-смесью-1 *Neisseria gonorrhoeae* 2).

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 в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» (кроме транспортной среды для мазков, ВКО комплексного, ВКО-FL и ОКО) хранить при температуре от 2 до 25 °С. Транспортную среду для мазков, ВКО комплексный, ВКО-FL, ОКО и комплект реагентов «ПЦР-комплект» хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплект реагентов «ЭФ» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации по качеству набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru⁶.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУ «Поликлиника №1»

Управления делами Президента Российской Федерации

Родионова

Е.Н. Родионова



Е.В. Ржевская

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!
Обратитесь к
инструкции по
применению



Код партии



Содержимого
достаточно для
проведения п-
количества тестов



Медицинское изделие для
диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
инструкции по
применению



Температурный диапазон



Не допускать
воздействия
солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 20 лист об

Заместитель директора по эпидемиологии - Врио
директора ФБУЗ ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора



В.Г. Акимкин