

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

В.И. Покровский

« ____ » _____ 2007 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК цитомегаловируса человека (CMV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле

«АмплиСенс® CMV»

Набор реагентов состоит из трех комплектов и выпускается в двух вариантах:

Вариант 1

- «ДНК-сорб-В» вариант 100 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала.

- «АмплиСенс» вариант 100 R – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК CMV человека.

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

Вариант 2

- «ДНК-сорб-А» или «ДНК-сорб-АМ» вариант 100 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала.

- «АмплиСенс» вариант 100 R – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК CMV человека.

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

ФОРМА ВЫПУСКА

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 100 включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г.Г. Онищенко

«_____» _____ 2007 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

набора реагентов для выявления ДНК цитомегаловируса человека (CMV)
в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле,

«АмплиСенс® CMV»

Набор реагентов состоит из трех комплектов и выпускается в двух вариантах:

Вариант 1

- «ДНК-сорб-В» вариант 100 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала.

- «АмплиСенс» вариант 100 R – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК CMV человека.

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

Вариант 2

- «ДНК-сорб-А» вариант 100 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала.

- «АмплиСенс» вариант 100 R – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК CMV человека.

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

ФОРМА ВЫПУСКА

Комплект реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 100 включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Количество
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича

Роспотребнадзора

Н.В.Медуницын

« 16 » 04 2007 г.



Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки

Комплект рассчитан на выделение ДНК из 100 проб, включая контрольные образцы.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-А» или «ДНК-сорб-АМ» вариант 100 включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Количество</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 флакона
Транспортная среда для мазков	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
ВКО комплексный – комплексный препарат внутреннего контрольного образца	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка
ОКО – отрицательный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект рассчитан на выделение ДНК из 100 проб, включая контрольные образцы.

Комплект реагентов «АмплиСенс» вариант 100 R включают:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Количество</i>
ПЦР-смесь-1-R CMV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,005	110 пробирок
ПЦР-смесь-2 blue	Прозрачная жидкость синего цвета	1,2	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 пробирка или капельница
ПКО ДНК CMV	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Дополнительно (в случае комплектации по варианту 1):

ОКО	Желтая опалесцирующая жидкость	1,6	1 пробирка
ВКО CMV+HSV	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

Комплект рассчитан на постановку 110 реакций амплификации, включая контрольные образцы.

Комплект реагентов «ЭФ» вариант 200 включает:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл), масса (г)</i>	<i>Количество</i>
Концентрированный трис-боратный буфер с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	50 мл	1 флакон
Агароза для электрофореза ДНК	Порошок белого цвета	1,7 г	2 флакона

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

НАЗНАЧЕНИЕ.

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

Для выделения ДНК из ликвора, слюны, клеточного осадка мочи, соскобов со слизистых целесообразно пользоваться комплектом «ДНК-сорб-А» или «ДНК-сорб-АМ».

Набор рассчитан на 100 постановок, включая контрольные образцы.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ.

Перед началом работы следует ознакомиться с Методическими рекомендациями «Забор, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», подготовленными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва, 2007).

Для проведения анализа может быть использован следующий клинический материал:

- Цельная кровь.** Взятие крови проводится утром натощак в пробирку типа Vacuette®, с 6 % раствором ЭДТА из расчета 50 мкл ЭДТА на 1 мл крови. Закрытую пробирку с кровью переворачивают 4-5 раз, чтобы перемешать консервант.
- Плазма крови.** В течение 8 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью, консервированной 6 % ЭДТА (см. п. 1), центрифугируют 10 мин при 3 тыс об/мин, после чего отбирают плазму отдельными наконечниками с аэрозольным барьером и переносят в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл типа «эппендорф». Хранить плазму можно не более 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 68 °С. Не допускается многократное замораживание-оттаивание материала. **Клеточный осадок** – 100 мкл исследуется отдельно.
- Ликвор, слюна** – 1 мл доставляется в лабораторию в день взятия материала.
- Моча** – 10-30 мл сразу после взятия пробу центрифугируют при максимальных оборотах микроцентрифуги (~ 10000 g) 10 мин. Надосадочную жидкость осторожно сливают, 0,2 мл осадка доставляют в лабораторию.

5. **Соскобы и биоптаты** помещают в 100 мкл транспортной среды или стерильного физиологического раствора.

Хранить материал можно не более 1 сут при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 68 °С. Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

Доставка проб осуществляется в термоконтейнере с охлаждающими элементами.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
2. При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги лица и слизистой глаз.
3. Анализ проводится в три этапа в трех отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».
4. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое. Персонал, работающий в комнате для детекции продуктов амплификации (зона 3), не должен посещать помещения для обработки клинического материала (зона 1) и проведения реакции ПЦР-амплификации (зона 2). Смена верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофоретического анализа.
5. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения ДНК из клинического материала требуются:

1. Стерильный ламинарный шкаф (например, БОВ-001-АМС, г. Миасс, Россия).
2. Твердотельный термостат для пробирок типа «эппендорф» на 25-100 °С (например, «Термо 24-

- 15» «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой (например, ОМ-1, г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для микропробирок типа «эппендорф» до 12-16 тыс g (например, «Elmi», «Hettish», «Eppendorf»).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2» фирмы «Биоком», Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
8. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл («Ахуген», США).
9. Штативы для микропробирок, наконечников («Хеликон», «Ленпипет»).
10. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 и до 1000 мкл («Ленпипет», «Ахуген»).
11. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с **аэрозольным барьером** до 100 и до 1000 мкл («Ахуген», США).
12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения амплификации (ПЦР) требуются:

1. Амплификатор (например, «Терцик» фирмы «ДНК-технология», Россия).
2. ПЦР-бокс (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», г. Миасс, Россия).
3. Вортекс (например, «ТЭТА-2» фирмы «Биоком», Россия).
4. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 (0,2) мл (например, «Ахуген», США).
6. Одноразовые наконечники для микропипеток до 200 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
8. Штативы для наконечников («Ленпипет») и микропробирок на 0,5 (0,2) мл («Хеликон»).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных ДНК.
10. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
11. Емкость для сброса наконечников.

ЗОНА 3.

Для электрофоретической детекции продуктов ПЦР требуются:

1. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл (SE-2, «Хеликон»).

2. Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (Эльф-4, «ДНК-технология»).
3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей («Биоком»).
4. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов («Биотест-1», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия; «BioRad», США).
5. Аквадистилятор.
6. Холодильник от 2 до 8 °С для хранения продуктов амплификации.
7. Микроволновая печь для плавления агарозы.
8. Колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы на 250 мл.
9. Мерный цилиндр на 1 л.
10. Штатив для микропробирок на 0,5 мл («Хеликон»).
11. Отдельная автоматическая пипетка 10-40 мкл («Ленпипет»).
12. Одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе («Ленпипет»).
13. Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.
14. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА КОМПЛЕКТОМ РЕАГЕНТОВ «ДНК-СОРБ-В»

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1** (если они хранились при температуре 2-8 °С) прогреть при температуре 60-65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО *CMV+HSV*** и по **300 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **лизирующим раствором и ВКО *CMV+HSV*** внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл отрицательного контрольного образца (ОКО)**. В пробирку положительного контроля (ПК) выделения внести **90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО ДНК *CMV***.
4. Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге. Если проба растворилась не полностью (при работе с цельной кровью, биоптатами, клеточными осадками), процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при максимальных оборотах и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новую пробирку.
5. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл ресуспендированного сорбента универсального**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

6. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить супернатант, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 8, удалить надосадочную жидкость полностью.
10. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
11. В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
12. Процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги в течение 1 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Пробы транспортировать аккуратно, не взмучивая сорбент.

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

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА КОМПЛЕКТОМ РЕАГЕНТОВ «ДНК-СОРБ-А»

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки клинического материала).

Объем клинического материала для выделения ДНК – 0,1 мл.

1. **Лизирующий раствор** (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 (включая отрицательный контроль выделения). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО комплексного** и по **300 мкл лизирующего раствора**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с лизирующим раствором и ВКО комплексным, внести по **100 мкл пробы**, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**.

4. Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге. Если проба растворилась не полностью, процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс об/мин и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новую пробирку.
5. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **20 мкл** ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
6. Осадить сорбент в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Добавить в пробы по **500 мкл отмывочного раствора**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Повторить отмывку еще раз, следуя пункту 7, удалить надосадочную жидкость полностью.
9. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
10. В пробирки добавить по **100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
11. Процентрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА КОМПЛЕКТОМ РЕАГЕНТОВ «ДНК-СОРБ-АМ»

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки клинического материала).

Объем клинического материала для выделения ДНК – 0,1 мл.

1. **Лизирующий раствор** (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 **1,5 мл** (включая отрицательный контроль) и, используя наконечник с аэрозольным барьером, внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО комплексного**.
3. 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.

4. В пробирки согласно маркировке внести по **100 мкл** клинического образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля выделения внести **100 мкл ОКО**.
5. Пробы 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 **2-3 мин** при комнатной температуре. Еще раз перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить в штативе **на 5 мин** при комнатной температуре.
6. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при **10 тыс об/мин. в течение 30 с**. Не захватывая сорбент универсальный, удалить супернатант в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без аэрозольного барьера.
7. Добавить в пробы по **1 мл отмывочного раствора**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального.
8. Повторить п.6.
9. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С на 5-10 мин.** для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
10. В пробирки добавить по **100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат с температурой **65 °С на 5 мин.**
11. Центрифугировать пробирки при **12 тыс об/мин** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Супернатант содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

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

ЭТАП 2. ПОСТАНОВКА ПЦР.

(проводится в ЗОНЕ 2 – комнате для раскапывания реагентов и проведения ПЦР-амплификации).

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

Во всех комплектах для ПЦР-амплификации «АмплиСенс» обязательно 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 температуры 95 °С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью-1-R CMV** и воском для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.

2. На поверхность воска внести по **10 мкл ПЦР-смеси-2 blue**, при этом ПЦР-смесь-2 blue не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-R *CMV*.
3. Сверху добавить по капле **масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
4. Взять подготовленные для ПЦР стерильные одноразовые пробирки на 0,5 (0,2) мл (плюс две контрольные). Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольными барьерами, внести по **10 мкл ДНК**, выделенной из клинических проб или контролей этапа выделения.
5. Дополнительные пробирки предназначены для **контрольных образцов этапа ПЦР** (см. ниже):
 - а) **отрицательный контрольный образец (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в подготовленную пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
 - б) **положительный контрольный образец (К+)** – **внести в пробирку 10 мкл положительно-го контрольного образца ПКО ДНК *CMV***;

Проведение амплификации.

1. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. табл. 1).

Таблица 1.

Программа для амплификации участка ДНК *CMV*.

Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке): «Терцик» (ДНК-технология)				Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке): «GeneAmp PCR System 2700» (Applied Biosystems), «Gradient Palm Cycler» (Corbett Research)			Амплификаторы с матричным регулированием температуры: «Uno-2» («Biometra»), «MiniCycler», «PTC-100» (MJ Research)		
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95 °C	пауза		95 °C	пауза		95 °C	пауза	
1	95 °C	5 мин	1	95 °C	5 мин	1	95 °C	5 мин	1
2	95 °C	10 с	42	95 °C	15 с	42	95 °C	1 мин	42
	65 °C	10 с		65 °C	25 с		65 °C	1 мин	
	72 °C	10 с		72 °C	25 с		72 °C	1 мин	
3	72 °C	1 мин	1	72 °C	1 мин	1	72 °C	1 мин	1
4	4 °C	хранение		4 °C	хранение		10 °C	хранение	

2. Когда температура в ячейке амплификатора достигнет 95 °C, поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

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

3. После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в комнату для анализа продуктов ПЦР (ЗОНУ 3). Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение недели 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.

ЭТАП 3. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

Проводится в ЗОНЕ 3 – комнате для анализа продуктов амплификации.

РАБОТА С АМПЛИФИЦИРОВАННЫМИ 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 парафильмом и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Этидия бромид – канцерогенное соединение, 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.

Все реагенты, содержащие этидия бромид, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке (см. раздел «Обеззараживание»).

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. 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°C.
3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее 3 см друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.
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, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду. ДНК, соответственно, движется к положи-

тельному. Залить в камеру 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 проб** 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 каждой пробы). В **каждом** ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен **К+** и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК.
2. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. При использовании камеры SE-2 («Хеликон», Россия) и источника питания «Эльф-4» (ЗАО «НПФ ДНК Технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18-20 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.
3. По завершении времени электрофореза (краситель крезоловый красный при этом пройдет примерно две трети длины геля – 2 см), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены специальным экраном).

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

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

Длина амплифицированных специфических фрагментов ДНК:

Цитомегаловируса (СМВ) – 500 п.н.

Внутреннего контрольного образца – 780 п.н.

Аналитическая чувствительность тест-системы – не менее 1×10^3 ГЭ на 1 мл клинической пробы при выделении комплектом реагентов «ДНК-сорб-В» и не менее 5×10^3 ГЭ на 1 мл клинической пробы при выделении комплектом реагентов «ДНК-сорб-А» или «ДНК-сорб-АМ».

Таблица 2.

Оценка результатов анализа контрольных образцов.

Контрольный образец	Какой этап ПЦР-анализа контролируется	Специфические полосы на электрофореграмме	
		Полоса 500 п.н.	Полоса 780 п.н.
ПК	Выделение ДНК	Есть	Есть
ОК	Выделение ДНК	Нет	Есть
К-	ПЦР	Нет	Нет
К+	ПЦР	Есть	Нет

1. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа выделения (ПК), должны быть яркая специфическая светящаяся оранжевая полоса на уровне **500 п.н.** и слабая полоса внутреннего контроля на уровне **780 п.н.**
2. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа выделения (ОК), должна быть только полоса внутреннего контроля на уровне **780 п.н.**
3. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К-), не должно быть никаких полос, за исключением праймер-димеров, находящихся ниже уровня 100 п.н.
4. В дорожке положительного контроля этапа ПЦР (К+) должна быть только полоса положительного контрольного образца – **500 п.н.**, и должна отсутствовать полоса внутреннего контрольного образца **780 п.н.**
5. **Положительными** считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне **500 п.н.** большей или меньшей интенсивности независимо от наличия полосы внутреннего контрольного образца. Полоса внутреннего контрольного образца может отсутствовать в пробах с высокой концентрацией ДНК цитомегаловируса (СМВ).
6. **Отрицательными** считаются образцы, которые содержат только полосу **780 п.н.** большей или меньшей интенсивности и не содержат полосу **500 п.н.**
7. Кроме полос **500 п.н.** и **780 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 таблице 2, то соответствующий этап анализа следует переделать.
2. Если в дорожке какого-либо из образцов отсутствуют обе полосы, и **500 п.н.** и **780 п.н.** Результат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повторить исследование этой клинической пробы с самого начала. Возможная причина: ошибка в процессе обработки клинического 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 **500 п.н.**, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также принять меры по выявлению источника контаминации.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание биоматериалов и реактивов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсосов на 20-24 ч в контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
2. Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 литров с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 ч. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 6 мес. Набор реактивов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. В соответствии с СП 3.3.2.1248-03; при температуре от 2 до 8 °С не более трёх суток. При получении набор реактивов разукomплектовать!

Хранение. В соответствии с СП 3.3.2.1248-03. Комплекты «ДНК-сорб-А» вариант 100 (кроме транспортной среды для мазков, ВКО комплексного и ОКО), «ДНК-сорб-В» вариант 100 хранятся при температуре от 2 до 25 °С. Комплект «АмплиСенс», транспортная среда для мазков, ВКО и ОКО хранятся при температуре от 2 до 8 °С. Комплект «ЭФ» вариант 200 хранится при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора «АмплиСенс® СМV» направлять в 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. (495) 241-39-22, факс (495) 241-92-38), и по адресу предприятия-изготовителя – ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. ОБТК (495) 305-54-24, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru).

Директор ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»
Роспотребнадзора



В.И. Покровский

Заведующая лабораторией СиК МБП
против арбовирусов, риккетсиозов,
и СПИД ФГУН ГИСК им.Тарасевича

Воробьева

М.С.Воробьева