УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения Республики Беларусь

_____ И.Г. Гоцкий
«18» 03 2015 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

_____ В.А. Горбунов
«10» 03 2015 г.

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ, АРБОВИРУСНЫХ И ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ –ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ «Белар-Буниа-Флави-Фило-Арена–ПЦР»

инструкция по применению

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора
УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»

_____ О.И. Зинченко
«17» 03 2015 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

_____ В.В. Гринь
«09» 02 2015 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач УЗ «Городская инфекционная клиническая больница»

_____ Н.Н. Юровский
«06» 02 2015 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

_____ В.А. Горбунов
«19» 02 2015 г.

Минск, 2014 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Тест-система «Белар-Буниа-Флави-Фило-Арена–ПЦР» представляет собой набор реагентов для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в агарозном геле с целью выявления РНК возбудителей природно-очаговых (ККГЛ, хантавирусы), арбовирусных (КЭ, ЗН, Денге) и особо опасных (Ласса, Марбург, Эбола) инфекций в клинических образцах пациентов (плазма крови).

Основой диагностической тест-системы являются специфические олигонуклеотиды (праймеры), комплементарные нуклеотидным последовательностям генов и фланкирующие фрагменты геномов вируса ККГЛ размером 228 нуклеотидных основания (н.о.), вируса Пуумала размером 365 н.о., вирусов КЭ, ЗН, Денге размером 95 н.о., вирусов Марбург и Эбола размером 419 н.о., вируса Ласса размером 197 н.о.

Основным свойством диагностической тест-системы является ее способность выявлять РНК вирусов в клинических образцах пациентов.

Анализ результатов проводят с помощью электрофореза продуктов амплификации в агарозном геле. Наличие специфических фрагментов генетического материала анализируемых вирусов определяют с помощью контрольных положительных проб (ПКО/BUNYA, ПКО/ARENA, ПКО/FLAVI, ПКО/FILO), содержащих в составе плазмидных ДНК специфические участки генома вирусов, амплифицированных одновременно с РНК, выделенными из проб клинического материала.

Постановку реакции следует производить, как это принято при работе с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, маске, сменном халате. Все использованные материалы необходимо подвергать обработке дезинфицирующими средствами в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.14-20-2005.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Диагностическая тест-система предназначена для проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в агарозном геле с целью выявления РНК возбудителей природно-очаговых, арбовирусных и особо опасных вирусных инфекций в клинических образцах пациентов (плазма крови), а также в пробах полевого материала: клещи, мышевидные грызуны, отловленные в природных очагах возбудителей инфекций.

Тест-система рассчитана на проведение 40 исследований, включая контрольные образцы.

2. СОСТАВ НАБОРА

- комплект №1 для проведения полимеразной цепной реакции

2.1	ПЦР-смесь-1/BUNYA	2 эп. (400 мкл)
2.2	ПЦР-смесь-2/FLAVI	2 эп. (400 мкл)
2.3	ПЦР-смесь-3/FILO	2 эп. (400 мкл)
2.4	ПЦР-смесь-4/ARENA	3 эп. (400 мкл)
2.5	Taq ДНК полимераза (5ед/мкл)	1 эп. (45 мкл)
2.6	ПКО/ BUNYA, ПКО/ FLAVI, ПКО/ FILO, ПКО/ ARENA	4 эп. (20 мкл)
2.7	Положительная контрольная проба $К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР	5 эп. (100 мкл)
2.8	Отрицательный контрольный образец – ОКО	1 эп. (500 мкл)
2.9	К- ПЦР	1 эп. (500 мкл)
2.10	Минеральное масло	2 эп. (1000 мкл)

-комплект №2 для анализа ПЦР-продуктов с помощью электрофореза в агарозном геле

2.11	50× TAE (с бромидом этидия)	1×25 мл
2.12	Агароза для электрофореза	2×1.8 г

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Набор реагентов рассчитан для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в агарозном геле с целью выявления РНК вирусов: ККГЛ, хантавирусов, КЭ, ЗН, Денге, Ласса, Марбург и Эбола.

Внимание: Тест-система **не укомплектована** наборами реагентов для выделения РНК и постановки реакции обратной транскрипции (ОТ).

Для экстракции РНК из плазмы крови рекомендуется использовать набор реагентов «РИБО-преп» производства «АмплиСенс», РФ; набор реагентов «QIAamp MinElute Virus Spin Kit», кат №57704, производства Qiagen, Германия, либо аналогичный; коммерческий препарат «TRI-Reagent», кат № T9424 производства Sigma, США, либо аналогичный. Для экстракции РНК из органов (легкие) мышевидных грызунов рекомендуется использовать набор реагентов «РИБО-преп» производства АмплиСенс, РФ; коммерческий препарат «TRI-Reagent», кат № T9424 производства Sigma, США, либо аналогичный.

Для постановки ОТ рекомендуется использовать коммерческий набор реагентов «Reverta L», производства АмплиСенс, РФ в соответствии с прилагаемой инструкцией.

3. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Меры предосторожности

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования (ПЦР) клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением «Правил противоэпидемического режима при работе с микроорганизмами 2 группы патогенности».

Работа проводится только в одноразовых перчатках, используются одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки. наконечники) обеззараживается 3-5%-ным раствором перекиси водорода в специальных контейнерах, после чего разрешается слив в общую канализационную сеть.

Постановку ПЦР осуществляют в 3 рабочих зонах. Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – выделение РНК из проб биологического материала. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, постановка реакции обратной транскрипции, внесение проб в микропробирки с ПЦР-реагентами, постановка ПЦР. Зона 3 – проведение амплификации. Пробы из Зоны 3 запрещается переносить в Зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей.

При утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР после амплификации, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

Пипетки или наконечники должны иметь аэрозольный барьер. Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую. Поверхности столов, а также помещения, где проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом.

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать набор по истечению срока годности.

4. МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

4.1 Набор реагентов «РИБО-преп» производства «АмплиСенс», РФ; набор реагентов «QIAamp MinElute Virus Spin Kit», кат №57704, производства Qiagen, Германия, либо аналогичный; коммерческий препарат «TRI-Reagent», кат № T9424 производства Sigma, США, либо аналогичный – **для экстракции РНК из плазмы крови.**

4.2 Набор реагентов «РИБО-преп» производства АмплиСенс, РФ; коммерческий препарат «TRI-Reagent», кат № T9424 производства Sigma, США, либо аналогичный - **для экстракции РНК из органов (легкие) мышевидных грызунов и клещей.**

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4.3 Набор реагентов «Reverta L», производства АмплиСенс, РФ - для постановки реакции ОТ.

4.4 Программируемый амплификатор (например, термоциклер Терцик производства «ДНК-технология», Россия; CG1-96 производства «Corbett Reserch», Австралия, либо аналогичный;

4.5 Настольный бокс с бактерицидной лампой (например, «Biocom» или любой другой марки) либо стерильный ламинарный шкаф (например, Kojair KR-125 Safety или любой другой марки).

4.6 Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25 – 100 °С (например, «Biocom» или любой другой марки).

4.7 Центрифуга-вортекс (любой марки).

4.8 Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин. (любой марки).

4.9 Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой (любой марки).

4.10 Набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», «Gilson» либо любой другой марки).

4.11 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.

4.12 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл.

4.13 Пробирки РНК- и ДНК-free типа «Эппендорф» на 1,5 мл, на 0,5 мл или на 0,2 мл.

4.14 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

4.15 Холодильник на 2 – 8 °С и на минус 20 °С, морозильник на минус 20 °С.

4.16 Ёмкость для сброса наконечников.

5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

5.1 Подготовка материала для исследования.

5.1.1 Получение плазмы крови.

Для получения плазмы забор крови производят натощак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл. Кровь из шприца аккуратно, без образования пены, переносят в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом (6% раствор ЭДТА в соотношении 1:20 или 3,8% раствор цитрата Na в соотношении 1:9). Гепарин в качестве коагулянта использовать нельзя (ингибирует ПЦР)! Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом). Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800 – 1600g (3000 об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в объеме не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

5.1.2 Подготовка суспензии ткани органов (легкие) мышевидных грызунов.

Для исследования используется ткань легкого мелких грызунов, поскольку эпителиальные клетки легочной ткани являются одним из мест интенсивной репликации хантавирусов.

Готовят 10% либо 20% суспензии ткани легкого (вес/объем) на фосфатно-солевом буфере (далее - ФСБ) или на физиологическом растворе. Количество ткани легкого, взятого для приготовления суспензии, должно быть не менее 0,1 г вещества.

Дезинтеграцию ткани органа допускается проводить двумя способами:

- разрушают ткань с использованием механического дезинтегратора любой марки, имеющего скорость вращения от 5000 до 30000 об/мин. В предварительно взвешенную пластиковую пробирку помещают кусочек ткани легкого, взвешивают и добавляют

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР
ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

буферный раствор в количестве, необходимом для получения 10-20% суспензии (для получения 10% суспензии к 0,2 г ткани добавляют 2 мл раствора). Обработку дезинтегратором проводят в течение 30 сек на холоду, после чего полученную взвесь осветляют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20-30 минут при 4±2 °С. Надосадочную жидкость осторожно отбирают в стерильные одноразовые пластиковые пробирки и используют для анализа, при необходимости полученную суспензию ткани легкого можно хранить в замороженном виде (-20 - 80°С) не более года. Допускается только однократное размораживание пробы;

- разрушают ткань вручную. Для этого предварительно охлажденные фарфоровый пестик и ступка помещаются на лед, в ступку вносятся стерильный кварцевый песок (либо мелко колотое стекло) кусочек ткани легкого, предварительно взвешенный, и необходимый объем буферного раствора. После растирания ткани взвесь переносят в центрифужные пробирки, осветляют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20-30 мин при 4±2 ^{0}С, надосадочную жидкость осторожно отбирают в стерильные одноразовые пластиковые пробирки и используют для анализа.

5.1.3 Подготовка клещевой суспензии.

Первоначально проводят отмывку клещей:

- клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл куда вносят 1 мл 96% этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 305 с при 2000 g (5000 об/мин на микроцентрифуге для удаления капель с крышки пробирки;

- с помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют спирт из пробирки;

- вносят в пробирку 1 мл 0,15 М раствора хлорида натрия (физиологический раствор), встряхивают пробирку и осаждают капли с крышки пробирки, как описано выше;

- с помощью вакуумного отсасывателя удаляют раствор хлорида натрия из пробирки;

- для приготовления суспензии клещей используют стерильные фарфоровые чашки и пестики. Клещей переносят в фарфоровую чашку, растирают в 200-300 мкл (если проба состоит из одного клеща) хлорида натрия и 0,7-1,0 мл раствора для пула из 7-10 клещей;

- полученную суспензию клещей переносят отдельными накочечниками с фильтром в микроцентрифужные пробирки и центрифугируют при 5000 об/мин в течение 2-3 мин для осветления пробы;

Для выделения РНК отбирают 100 мкл надосадочной жидкости.

5.2. Выделение РНК проводится в Зоне 1 согласно инструкции производителя к используемым наборам для выделения РНК.

ВНИМАНИЕ: Для контроля стадии выделения одновременно с исследуемыми образцами проводится выделение РНК из 100 мкл контрольных образцов (ОКО, К$^{+LAS}$ ОТ-ПЦР).

5.3 Постановка реакции обратной транскрипции (ОТ) – проводится в Зоне 2 – осуществляется с использованием коммерческого набора реагентов «Reverta L», производства АмплиСенс, РФ, в соответствии с прилагаемой инструкцией. Полученная в результате кДНК используется в дальнейшем для постановки ПЦР.

5.4. Постановка полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени – проводится в Зонах 2 и 3.

Выбор микропробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора .

Для внесения в пробирки реагентов, проб комплементарной ДНК (кДНК), полученной в результате постановки ОТ (п.5.3) и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Общий объем реакционной смеси составляет 50 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

ВНИМАНИЕ: полученная кДНК каждой анализируемой пробы может исследоваться одновременно в четырех пробирках: с 4–мя ПЦР-смесями (ПЦР-смесь-1/BUNYA, ПЦР-смесь-2/FLAVI, ПЦР-смесь-3/FILO, ПЦР-смесь-2/ARENA), либо в одной, двух, трех пробирках в зависимости от выбранных ПЦР-смесей.

5.4.1 Разморозить, тщательно перемешать на вортексе: ПЦР-смесь-1/BUNYA, ПЦР-смесь-2/FLAVI, ПЦР-смесь-3/FILO, ПЦР-смесь-4/ARENA, ПКО/BUNYA, ПКО/ARENA, ПКО/FLAVI, ПКО/FILO, $К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР, ОКО. $К^{-}$ ПЦР и осадить капли с крышек пробирок.

5.4.2 Фермент Taq ДНК полимеразу достать из морозильника, перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки и поместить на хладоэлемент либо на ледяную баню.

Смешать в чистых отдельных пробирках реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов для раздельного проведения исследований на каждую группу патогенов согласно **таблице 1:**

ПЦР-смесь	Образцы, тестируемые за одну постановку (исследуемы пробы и необходимые контроли)	Кол-во	Объем ПЦР-смеси	Объем Taq ДНК полимеразы
ПЦР-смесь-1/ BUNYA	ПКО/ BUNYA	1	**400 мкл**	**5 мкл**
	ОКО (кДНК, п.5.3)	1		
	$К^{-}$ ПЦР	1		
	Исследуемые образцы (кДНК, п.5.3)	7		
	ВСЕГО	10		
ПЦР-смесь-4/ ARENA	$К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР (кДНК, п.5.3)	1	**40 мкл**	**1 мкл**
ПЦР-смесь-2/ FLAVI	ПКО/FLAVI	1	**400 мкл**	**5 мкл**
	ОКО (кДНК, п.5.3)	1		
	$К^{-}$ ПЦР	1		
	Исследуемые образцы (кДНК, п.5.3)	6		
	ВСЕГО	10		
ПЦР-смесь-4/ ARENA	$К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР (кДНК, п.5.3)	1	**40 мкл**	**1 мкл**
ПЦР-смесь-3/ FILO	ПКО/FILO	1	**400 мкл**	**5 мкл**
	ОКО (кДНК, п.5.3)	1		
	$К^{-}$ ПЦР	1		
	Исследуемые образцы (кДНК, п.5.3)	7		
	ВСЕГО	10		
ПЦР-смесь-4/ ARENA	$К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР (кДНК, п.5.3)	1	**40 мкл**	**1 мкл**
ПЦР-смесь-4/ ARENA	ПКО/ARENA	1	**400 мкл**	**5 мкл**
	$К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР (кДНК, п.5.3)	1		
	ОКО (кДНК, п.5.3)	1		
	$К^{-}$ ПЦР	1		
	Исследуемые образцы (кДНК, п.5.3)	6		
	ВСЕГО	10		

Для одновременной постановки реакции на все 4 группы патогенов смешать в чистых отдельных пробирках реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов согласно **таблице 2:**

ПЦР-смесь	Образцы, тестируемые за одну постановку (исследуемы пробы и необходимые контроли)	Кол-во	Объем ПЦР-смеси	Объем Taq ДНК полимеразы
ПЦР-смесь-1/ BUNYA	ПКО/ BUNYA	1	**400 мкл**	**5 мкл**
	ОКО (кДНК, п.5.3)	1		

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

	$К^-$ ПЦР	1		
	Исследуемые образцы (кДНК, п.5.3)	7		
	ВСЕГО	10		
ПЦР-смесь-2/ FLAVI	ПКО/FLAVI	1	**400 мкл**	**5 мкл**
	ОКО (кДНК, п.5.3)	1		
	$К^-$ ПЦР	1		
	Исследуемые образцы (кДНК, п.5.3)	7		
	ВСЕГО	10		
ПЦР-смесь-3/ FILO	ПКО/FILO	1	**400 мкл**	**5 мкл**
	ОКО (кДНК, п.5.3)	1		
	$К^-$ ПЦР	1		
	Исследуемые образцы (кДНК, п.5.3)	7		
	ВСЕГО	10		
ПЦР-смесь-4/ ARENA	ПКО/ARENA	1	**400 мкл**	**5 мкл**
	$К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР (кДНК, п.5.3)	1		
	ОКО (кДНК, п.5.3)	1		
	$К^-$ ПЦР	1		
	Исследуемые образцы (кДНК, п.5.3)	6		
	ВСЕГО	10		

5.4.3 Внести приготовленные смеси в микропробирки по 40 мкл. Сверху **на смесь** наслаивают по капле минерального масла (примерно 25 мкл). Используя наконечник с фильтром, добавить **под масло** по 10 мкл кДНК исследуемых проб и необходимых контролей в пробирки с каждой реакционной смесью в соответствии с приведенной выше таблицей. Для удаления пузырьков и осаждения капель со стенок пробирок осуществить их кратковременное центрифугирование на микроцентрифуге-вортексе в течение нескольких секунд.

5.4.4 Запрограммировать прибор (термоциклер с активным регулированием) для выполнения соответствующей программы амплификации (находится в Зоне 3):

Цикл	Температура °С	Время	Количество циклов
1	95	2 мин	1
2	94	15 с	35
	54	30 с	
	72	45 с	

5.4.5 Установить микропробирки в ячейки прибора и запустить выполнение программы.

После окончания реакции пробирки достают из амплификатора и используют для анализа ПЦР-продуктов. Пробы после амплификации можно хранить 16 часов при комнатной температуре либо в течение недели при 2 – 8 ^{0}С.

5.5 Регистрация и оценка результатов – *проводится в Зоне 3.*

5.5.1 Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза

5.5.1.1 Готовят 1XTAE буфер на дистиллированной воде разбавлением 50XTAE (комплект №2) в 50 раз (например: для получения 500 мл 1xTAE необходимо к 10 мл 50XTAE добавить 490 мл дистиллированной воды).

5.5.1.2 Заливают в аппарат для электрофореза приготовленный 1XTAE буфер.

5.5.1.3 Высыпают содержимое флакона с агарозой (1,8 г) из комплекта №2 в стеклянную колбу из термостойкого стекла, добавляют 100 мл 1XTAE буфера.

5.5.1.4 Приготовленную смесь расплавляют на электрической плите или в СВЧ-печи.

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР
ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5.5.1.5 Охлаждают расплавленную агарозу до температуры 50 - 60°С и заливают в планшет для заливки геля, устанавливают на планшет гребенку для получения в агарозном геле карманов (лунок) для нанесения образцов. После застывания агарозы осторожно вынимают гребенку из геля и переносят гель в камеру для проведения электрофореза, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду. ДНК, соответственно, движется к положительному. При этом электродный буфер должен покрывать гель на 5 мм сверху.

5.5.1.6 Аккуратно отобрать **из-под слоя масла** по **15 мкл** ПЦР-продукта (в зависимости от объема лунок можно вносить от 10 до 20 мкл образца), полученного в результате полимеразной цепной реакции и внести в лунки геля. При этом порядок нанесения должен соответствовать нумерации проб. Обязательно наносят контроли, причем в каждом ряду лунок геля должен быть обязательно представлен К+.

5.5.1.7 Подключают электрофоретическую камеру к источнику питания и задают напряжение 10 В/см геля.

5.5.1.8 Останавливают электрофорез, когда краситель в пробе образца пройдет в геле не менее 3 см.

5.5.2 Учет результатов

Учет результатов проводят при просмотре гелей в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе. При наличии в анализируемых пробах РНК вирусов в результате постановки ПЦР и проведения электрофореза в геле появляются красно-оранжевые флуоресцирующие полосы, соответствующие амплифицированным фрагментам определенной (заданной) длины. Расположение полос, соответствующих фрагментам генома вирусов, в пробах образцов должно быть на уровне полос в положительных контролях. В отрицательном контрольном образце и К⁻ ПЦР полосы, соответствующие заданным фрагментам ДНК, должны отсутствовать.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных (ПКО/BUNYA, ПКО/ARENA, ПКО/FLAVI, ПКО/FILO) и отрицательного (К⁻ПЦР) контролей амплификации, положительного ($К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР) и отрицательного (ОКО) контролей экстракции РНК, ОТ и ПЦР, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 3).

Таблица 3 Результаты для контролей различных этапов ПЦР-исследования

ПЦР-смесь	Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Конечный продукт амплификации (п.о.)
ПЦР-смесь-1/ BUNYA	референс ККГЛ	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	228
	референс Пуумала	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	365
	ПКО/ BUNYA	ПЦР	228 (ККГЛ) 365 (Пуумала)
	ОКО	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	отсутствует
	К⁻ ПЦР	ПЦР	отсутствует
ПЦР-смесь-4/ ARENA	$К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	197
ПЦР-смесь-2/ FLAVI	референс ЗН, КЭ, Денге	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	95
	ПКО/ FLAVI	ПЦР	95
	ОКО	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	отсутствует
	К⁻ ПЦР	ПЦР	отсутствует
ПЦР-смесь-4/ ARENA	$К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	197

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПЦР-смесь-3/ FILO	референс Марбург и Эбола	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	419
	ПКО/ FILO	ПЦР	419
	ОКО	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	отсутствует
	$К^-$ ПЦР	ПЦР	отсутствует
ПЦР-смесь-4/ ARENA	$К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	197
ПЦР-смесь-4/ ARENA	референс Ласса	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	197
	ПКО/ ARENA	ПЦР	197
	ОКО	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	отсутствует
	$К^-$ ПЦР	ПЦР	отсутствует
	$К^{+LAS}$ ОТ-ПЦР	Экстракция РНК, ОТ, ПЦР	197

Полученные результаты документируют фотографированием гелей с использованием оранжевого светофильтра.

6. ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система «Белар-Буниа-Флави-Фило-Арена–ПЦР» выпускается в виде упакованного набора. Тест-система рассчитана на проведение 40 исследований, включая контрольные образцы.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Хранение тест-системы должно производиться в чистом, темном месте при температуре минус $(-20\pm2)^0$С для комплекта №1 и $(+4\pm2)^0$С для комплекта №2 на протяжении всего срока годности тест-системы. Срок годности тест-системы – 12 месяцев с даты изготовления.

Разработчики

Руководитель лаборатории _____ А.С. Владыко

Руководитель лаборатории _____ А.Г. Красько

Ведущий научный сотрудник _____ Е.П. Счеслёнок

Ведущий научный сотрудник _____ П.А. Семижон

Ведущий научный сотрудник _____ Е.Г. Фомина

Минздрав РБ
Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
Для нормативных документов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru