

МЕТОДИКА проведения исследования клинического материала (сыворотка, плазма, клеточная масса крови) на наличие ДНК возбудителей инфекций методом ПЦР

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ СХЕМА ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ

с использованием наборов реагентов:

ПОЛИГЕП В (*Hepatitis B virus*)
ГЕРПОЛ (*Herpes simplex virus 2*)
ГЕРПОЛ 1+2 (*Herpes simplex virus 1+2*)
ГЕРПОЛ 6 (*Herpes human virus 6*)
ЦИТОПОЛ (*Cytomegalovirus*)
ЭБАРПОЛ (*Epstein Barr virus*)

выделение ДНК из биопроб - «**Набор для выделения ДНК/РНК из сыворотки и плазмы крови**»

ПРИНЦИП РАБОТЫ МЕТОДА

В основе метода лежит выявление специфического фрагмента ДНК микроорганизма путем накопления (амплификации) копий данного фрагмента (ДНК-мишени) в процессе синтеза новых цепей ДНК.

Полимеразная цепная реакция представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеозид-трифосфатов (дНТФ), соответствующего солевого буфера и олигонуклеотидных затравок - праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка ДНК-мишени.

Каждый цикл состоит из трех стадий с различными температурными режимами. На первой стадии при 94°C происходит разделение цепей ДНК, затем при 57-62°C - присоединение (отжиг) праймеров к гомологичным последовательностям на ДНК-мишени, и при температуре 72°C протекает синтез новых цепей ДНК путем удлинения праймера в направлении 5'-3'.

В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет за 35 циклов наработать фрагмент ДНК, ограниченный парой выбранных праймеров, в количестве, достаточном для его детекции с помощью электрофореза.

Проведение ПЦР-анализа включает 3 лабораторных этапа:

1. обработка клинических проб (выделение ДНК);
2. постановка реакции ПЦР (амплификация);
3. детекция продуктов амплификации (в данной методике - электрофоретическое разделение продуктов в агарозном геле).

ТРЕБОВАНИЯ К ПОМЕЩЕНИЯМ И ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТ

Требования к помещениям и организации работ изложены в Методических указаниях МУ 1.3.1888-04 "Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности" (Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 04 марта 2004г).

Требования к проведению работ с патогенными микроорганизмами изложены в Санитарных правилах СП 1.2.731-99 "Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами" 1999г.

НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ и РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1 этап - выделение ДНК из биопроб:

- ламинарный бокс 2 класса защиты;
- твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до 99°C;
- высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8-12 тыс.об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3тыс.об/мин (или вортекс);
- пипетки-дозаторы переменного объема (5-50; 20-200; 100-1000 мкл);
- вакуумный аспиратор (насос) с колбой-ловушкой;
- штатив для хранения пробирок 1,5 мл;
- штатив для пробирок 1,5 мл «рабочее место»;
- одноразовые наконечники для дозаторов до 200 мкл и до 1000 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения клинического материала;
- одноразовые перчатки;
- комплект «Набор для выделения ДНК/РНК из сыворотки и плазмы крови» (универсален для всех возбудителей, присутствующих в анализируемом материале).

2 этап - проведение ПЦР (амплификация):

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- программируемый термостат амплификатор);
- микроцентрифуга-вортекс 1,5-3тыс.об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5 - 50 мкл для работы с биопробами;
- пипетки-дозаторы переменного объема (0,5 - 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл) для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации;
- одноразовые наконечники до 200 мкл и до 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов ;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл для биопроб;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;
- емкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- комплект реагентов для проведения ПЦР (индивидуален для каждого возбудителя);

3 этап - детекция продуктов амплификации:

- камера для горизонтального электрофореза;
- источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В;
- УФ-трансиллюминатор;
- СВЧ-печь для плавления агарозы;
- технические весы для взвешивания агарозы;
- аквадистиллятор;
- видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным кабинетом или

- тубусом, подключенная к персональному компьютеру;
- пипетка-дозатор переменного объема 5 - 50 мкл для нанесения образцов на гель;
- пипетка-дозатор переменного объема 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники до 200 мкл для нанесения образцов;
- одноразовые наконечники до 1000 мкл;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- агароза, раствор бромистого этидия, 50xTAE буфер для приготовления геля и проведения электрофореза (или готовый комплект реагентов для электрофоретической детекции);
- пластиковая емкость большого объема для дезактивации буфера и гелей;

СОСТАВ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ для ПЦР

В состав набора реагентов входят три комплекта :

1. Комплект для пробоподготовки (выделения ДНК)

«Набор для выделения ДНК/РНК из сыворотки или плазмы крови» (кат.№ 020201) (на 100 образцов):

1. Денатурирующий раствор 45 мл
2. Изопропиловый спирт 30 мл
3. Промывочный раствор 100 мл
4. Раствор носителя (т-РНК) 300 мкл
5. Вода деионизованная..... 5 мл
6. Хлороформ..... 12 мл

2. Комплект для проведения ПЦР (амплификации)

Данные комплекты выпускаются в пяти различных форматах в зависимости от количества реакций и степени их готовности к постановке реакции. Описание форматов см. таблицу

Описание форматов комплектов для проведение ПЦР

Формат, маркировка	Кол-во исследований	состав	Степень готовности к проведению реакции
НАИМЕНОВАНИЕ (50)	50 исследуемых образцов + 5 отрицательных контролей + 5 положительных контролей (всего 60 реакций)	1. Реакционная смесь—155 мкл; 2. Taq-полимераза—13 мкл; 3. Разбавитель—2 мл; 4. Минеральное масло—2 мл; 5. Положительный контрольный образец ДНК—25 мкл	Требуется предварительное смешение компонентов
НАИМЕНОВАНИЕ (100)	100 исследуемых образцов + 10 отрицательных контролей + 10 положительных контролей (всего 120 реакций)	1. Реакционная смесь—305 мкл; 2. Taq-полимераза—25 мкл; 3. Разбавитель—2 мл; 4. Минеральное масло—2 мл; 5. Положительный контрольный образец ДНК—55 мкл	
НАИМЕНОВАНИЕ (200)	200 исследуемых образцов + 20 отрицательных контролей + 20 положительных контролей (всего 240 реакций)	1. Реакционная смесь—600 мкл; 2. Taq-полимераза—50 мкл; 3. Разбавитель—4 мл; 4. Минеральное масло—4 мл; 5. Положительный контрольный образец ДНК—100 мкл	
НАИМЕНОВАНИЕ (50) P05, формат OneStep	49 исследуемых образцов + 5 отрицательных контролей + 5 положительных контролей	1. Готовая смесь для амплификации под слоем масла— 54 пробирки объемом 0,5мл по 25 мкл; 2. Разбавитель—0,1 мл; 3. Готовый к применению положительный контрольный образец ДНК—5 пробирок объемом 0,5мл по 30мкл;	Полностью готовые к применению смеси расфасованные в индивидуальные пробирки. Требуется только добавить анализируемую пробу.
НАИМЕНОВАНИЕ	49 исследуемых образцов +	1. Готовая смесь для амплификации под	Положительный

(50) P02, формат OneStep	5 отрицательных контролей+ 5 положительных контролей	слоем масла— 54 пробирки объемом 0,2мл по 25 мкл; 2. Разбавитель—0,1мл; 3. Готовый к применению положительный контрольный образец ДНК—5 пробирок объемом 0,2мл по 30мкл;	контрольный образец готов к постановке в амплификатор.
--------------------------	---	---	--

Наименование набора	форматы				
	(50)	(100)	(200)	(50) P05	(50) P02
ПОЛИГЕП В (<i>Hepatitis B virus</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
ГЕРПОЛ (<i>HSV2</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
ГЕРПОЛ 1+2 (<i>HSV1+2</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ЦИТОПОЛ (<i>Cytomegalovirus</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ГЕРПОЛ 6 (<i>Herpes human virus б.</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
ЭБАРПОЛ (<i>Epstein Barr virus</i>)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

3. Комплект для детекции продуктов амплификации

Для детекции продуктов амплификации можно использовать как готовые комплекты, так и отдельные реагенты.

Готовые комплекты:

Комплект №1 (кат №030106) (на 100 –150 образцов)

агароза-2х2г, 50хТАЕ буфер-25 мл, раствор бромистого этидия-30мкл

Комплект №2 (кат №030107) (на 120 образцов)

2% агарозный гель (40 лунок) –3шт, 50хТАЕ буфер-25 мл

Отдельные реагенты:

- Агароза (100г/уп; 2г/уп) (кат №030101)
- Раствор бромистого этидия (1мл/уп) (кат №030104)
- 50хТАЕ буфер (200 мл/уп; 120мл/уп) (кат №030102)
- 2% агарозный гель для электрофореза (40 лунок)(1шт/уп; 5шт/уп)(кат №030108)

ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. ВЫБОР АНАЛИЗИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Выбор клинического материала для исследования определяется наиболее вероятным местом локализации возбудителя. Наиболее адекватный материал для выявления возбудителей приведен в таблице .

Возбудитель	Адекватный материал для выявления		
	Сыворотка крови	Плазма крови	Лейкоцитарная масса крови*
<i>Hepatitis B virus</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

<i>Herpes simplex virus 1,2</i>			<input type="checkbox"/>
<i>Cytomegalovirus</i>			<input type="checkbox"/>
<i>Herpes human virus 6</i>			<input type="checkbox"/>
<i>Epstein Barr virus</i>			<input type="checkbox"/>

2. ВЗЯТИЕ, ДОСТАВКА и ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА

Для получения **сыворотки** венозную кровь собрать в сухую одноразовую пластиковую пробирку и дать крови свернуться (30 мин при комнатной температуре до полного образования сгустка). Пробирку центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре, полученную сыворотку переносят в чистую сухую полипропиленовую пробирку типа Эппендорфф объемом 1,5мл, используя наконечник с фильтром.

Для получения **плазмы** венозную кровь собрать в одноразовую пластиковую пробирку с раствором антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта). *Гепарин использовать не рекомендуется.* Пробирку центрифугировать 20 минут при 3000 об/мин при комнатной температуре, полученную плазму (верхняя фаза) перенести индивидуальным наконечником с фильтром в сухую одноразовую пластиковую пробирку и использовать для выделения ДНК.

Для получения **клеточной массы** крови 500 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 50 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия). *Гепарин использовать не рекомендуется.* Пробирку центрифугировать 5 минут при 3000 об/мин, при комнатной температуре. Плазму (верхняя фаза) отбросить с использованием индивидуального наконечника. Полученную клеточную массу крови использовать для выделения ДНК.

Цельная нативная кровь *хранению не подлежит!*

Неохлажденные образцы сыворотки, плазмы и клеточной массы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК. Допускается **хранение** при +4...+8°C не более 1 суток, при -18...-20°C—не более 2-х недель.

Доставка обработанных проб в лабораторию должна проводиться в термосе со льдом или в термоконтейнере в течение 12 часов.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

3.1. В чистые полипропиленовые пробирки типа Эппендорфф объемом 1,5 мл внести по 3 мкл носителя и 450 мкл денатурирующего раствора.

Денатурирующий раствор содержит фенол! Избегать попадания на кожу и слизистые оболочки.

Пронумеровать пробирки и расположить соответствующим образом в штативе.

3.2. Добавить 50 мкл исследуемой сыворотки или плазмы (или 100 мкл клеточной массы крови) в соответствующие пробирки, используя наконечники с фильтрами. Пробирки плотно закрыть!

3.3. Тщательно перемешать на вортексе в течение 10 сек, а затем инкубировать при комнатной температуре 10 минут.

3.4. Центрифугировать в течение 15 секунд при 12 тыс.об/мин. *Высокоскоростное центрифугирование проводить в центрифуге с крышкой, для обеспечения плотного прижимания крышек пробирок. После каждого этапа центрифугирования желателно протереть внутреннюю поверхность прижимной крышки и поверхность ротора дез.раствором.*

3.5. Добавить 100 мкл **хлороформа**, плотно закрыть пробирки и перемешать на вортексе 5 секунд.

3.6. Центрифугировать 5 минут при 12 тыс.об/мин.

3.7. Перенести до 300 мкл верхней водной фазы в чистую полипропиленовую пробирку типа Эппендорфф объемом 1,5 мл, содержащую 300 мкл **изопропилового спирта**, используя наконечники с фильтрами. Перемешать на вортексе 5 сек.

3.8. Центрифугировать 12 минут при 12 тыс.об/мин.

В результате данной манипуляции образуется полупрозрачный рыхлый осадок.

3.9. Удалить супернатант вакуумным аспиратором в колбу-ловушку, с использованием

одноразовых наконечников, оставляя на дне пробирки около 20 мкл жидкости. *Данную манипуляцию проводить с особой осторожностью, постепенно удаляя супернатант только с верхнего слоя жидкости и не допуская захвата рыхлого осадка. Рекомендуется ориентировать пробирки в роторе центрифуги, обозначая таким образом местоположение осадка.*

- 3.10.** В пробирку с осадком добавить 1 мл **промывочного раствора**. Пробирки плотно закрыть, перемешать на вортексе и центрифугировать 10 минут при 12 тыс.об/мин.
- 3.11.** Удалить супернатант как можно полнее вакуумным аспиратором в колбу-ловушку, не захватив при этом осадок. Осадок подсушить 20-30 минут при комнатной температуре, оставляя пробирки открытыми.
- 3.12.** Добавить 50 мкл **деионизованной воды**, пробирки закрыть, инкубировать 10 минут при комнатной температуре, затем перемешать встряхиванием.
- Раствор очищенной ДНК можно хранить при $-18...-20^{\circ}\text{C}$ в течение двух недель.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР (амплификация)

- 4.1.** Приготовить и пронумеровать пробирки для проведения амплификации вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) в соответствии с количеством анализируемых проб на наличие ДНК выбранного возбудителя. Подготовить и промаркировать пробирки для положительного (маркировка «К+») и отрицательного (маркировка «К-») контрольных образцов. При использовании комплекта ГЕРПОЛ 1+2 реакция стянется с двумя положительными контрольными образцами.

ПРИМЕЧАНИЕ: Для комплектов реагентов формата OneStep (готовая к применению расфасованная по индивидуальным пробиркам амплификационная смесь) маркируются пробирки с готовой смесью для анализируемых проб и пробирки для отрицательного контрольного образца. Пробирки с положительным контрольным образцом полностью готовы к постановке в амплификатор. Проведение амплификации для наборов формата One Step начинается с п.4.7.

- 4.2.** За 20-30 минут до приготовления рабочей амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для ПЦР (амплификации) из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирки с реакционной смесью и полностью размороженным раствором разбавителя тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.
- 4.3.** Из компонентов набора приготовить смесь реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу:
Рекомендуется готовить смесь реагентов не менее чем на 5 реакций для достоверной дозировки объема фермента
- 17,5 мкл разбавителя,**
2,5 мкл реакционной смеси,
0,2 мкл Taq-полимеразы

При приготовлении рабочей амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

- 4.4.** После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.
- 4.5.** Добавить по 20 мкл рабочей амплификационной смеси во все пробирки, подготовленные для амплификации.
- 4.6.** Добавить во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.
- 4.7.** Внести 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. выделение ДНК) в соответствующую пробирку с рабочей амплификационной смесью под слой масла.
- 4.8.** Внести в пробирки для положительных контрольных образцов по 5 мкл соответствующего положительного контрольного образца ДНК, а в пробирку для отрицательного контрольного образца – 5 мкл разбавителя, используя индивидуальные наконечники с фильтрами.

ПРИМЕЧАНИЕ: В комплектах реагентов формата One Step (готовая к применению расфасованная по индивидуальным пробиркам амплификационная смесь) положительный контрольный образец полностью готов к постановке в программируемый термостат (амплификатор)

4.9. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1,5– 3000 об/мин при комнатной температуре (+18...+25°C) на микроцентрифуге-вортексе.

4.10. Перенести пробирки в прогретый до температуры +93°C (или+94°C) (установившаяся температура в режиме Пауза) программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующим программам:

ПОЛИГЕП В (HBV)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94 °	Pause	
94 °	30 сек	1
94 °	20 сек	5
65 °	20 сек	
72 °	5 сек	
92 °	5 сек	35
65 °	10сек	
72 °	15 сек	
10 °	Storage	
ГЕРПОЛ (HSV II) ГЕРПОЛ 1+2 (HSV I+II)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94 °	Pause	
94 °	30 сек	1
94 °	30 сек	5
64 °	40 сек	
93 °	10сек	30
62 °	10сек	
72 °	5 сек	
10 °	Storage	
ЭБАРПОЛ (Epstein-Barr virus)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94 °	Pause	
94 °	30 сек	1
94 °	40 сек	3
64 °	40 сек	
72 °	40сек	
92 °	10 сек	32
62 °	10 сек	
72 °	10сек	
10 °	Storage	
ЦИТОПОЛ (Cytomegalovirus)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
94 °	Pause	
94 °	30 сек	1
93 °	10сек	40
68 °	20сек	
72 °	20 сек	
10 °	Storage	

ГЕРПОЛ 6 (<i>Herpes human virus 6</i>)		
<i>T, °C</i>	<i>время</i>	<i>циклов</i>
93 °	Pause	
93 °	30 сек	1
93 °	10сек	35
60 °	10сек	
72 °	10 сек	
72 °	1 мин	
10 °	Storage	

Для амплификатора Терцик: режим регулирования – точный; объем реакционной смеси – 40 мкл

6. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза

- 6.1.** Залить в аппарат для электрофореза ТАЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ в 50 раз.
- 6.2.** К 2,0 г агарозы добавить 2 мл 50х ТАЕ буфера и 100 мл дистиллированной воды.
- 6.3.** Приготовленную смесь расплавить на электрической плите или в СВЧ-печи. Добавить к 100 мл расплавленной агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия. Перемешать.
- 6.4.** Охладить расплавленную агарозу до температуры 50-60°C и залить в планшет для заливки геля. Для получения в агарозном геле карманов для нанесения образцов установить на планшет гребенку, используя зажим типа «бульдог». После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза.
- 6.5.** Нанести в карманы геля по 10-15 мкл амплификата в последовательности соответствующей нумерации проб. Нанести положительные и отрицательные контроли.
- 6.6.** Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/См геля. Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта 1,5-2см.

Визуализация результатов электрофореза

- 6.7.** Вынуть гель из формы и перенести его на стекло УФ-трансиллюминатора.
ВНИМАНИЕ! С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном.
- 6.8.** Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

7. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

- 7.1.** В отрицательном контрольном образце (К-) для наборов с внутренним контролем должна выявляться одна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю (ВК). Появление второй полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.

Для наборов без внутреннего контроля полосы должны отсутствовать. Появление полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.

- 7.2.** В положительном контрольном образце (К+) для наборов с внутренним контролем должны выявляться две полосы: 1)полоса оранжево-красного цвета, соответствующая положительному контролю (ПК); 2)полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю

(ВК).

Для наборов без внутреннего контроля должна выявляться одна полоса, соответствующая ПК.

7.3. Анализируемые пробы:

отсутствие полосы оранжево-красного цвета строго на уровне положительного контроля (ПК) свидетельствует об отсутствии ДНК искомого возбудителя в анализируемой пробе;

наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю – о присутствии ДНК искомого возбудителя в анализируемой пробе.

Во всех отрицательных образцах должна выявляться полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю ВК.

Если в анализируемом образце для наборов с внутренним контролем отсутствует как полоса положительного контроля, так и полоса внутреннего контроля, это означает, что реакция амплификации не прошла (возможные причины: проба содержит вещества, ингибирующие ПЦР, неадекватная работа амплификатора, ошибка выполнения протокола проведения анализа). В этом случае необходимо провести Примечание: Если в пробе присутствует большое количество ДНК искомого возбудителя, то на гель-электрофореграмме может не наблюдаться полосы внутреннего контроля (Проба 3 из таблицы). Это вполне допустимая ситуация и такие пробы следует интерпретировать как положительные.

Набор	возбудитель	фрагмент ПК, п.н.	фрагмент ВК, п.н.
ПОЛИГЕП В	<i>Hepatitis B virus</i>	311	500
ГЕРПОЛ	<i>Herpes simplex virus 2</i>	227	400
ГЕРПОЛ 1+2	<i>Herpes simplex virus 1+2</i>	HSV1: 179 270	HSV2: 530
ЦИТОПОЛ	<i>Cytomegalovirus</i>	388	800
ЭБАРПОЛ	<i>Epstein-Barr virus</i>	378	550
ГЕРПОЛ 6	<i>Herpes human virus 6</i>	240	отсутствует

8. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контрольные образцы

Полосы фрагментов ДНК	K+	K-	K+	K-
ПК	+	--	--	+
ВК	+	+	--	+
Интерпретация	Амплификация прошла, методика анализа соблюдена		Амплификация не прошла (в пробе присутствуют ингибиторы или нарушена методика проведения анализа)	
	Контаминация (загрязнение) компонентов набора			

Анализируемые пробы

Полосы фрагментов ДНК	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4
ПК	+	--	+	--
ВК	+	+	--	--
Интерпретация	Присутствие ДНК искомого возбудителя	Отсутствие ДНК искомого возбудителя	Присутствие ДНК искомого возбудителя	Амплификация не прошла (в пробе присутствуют ингибиторы или нарушена методика проведения анализа)

9. ДЕЙСТВИЯ В СЛУЧАЕ ИНГИБИРОВАНИЯ РЕАКЦИИ ПЦР

- 9.1.** При отсутствии в анализируемых образцах как полосы ВК, так и полосы ПК (ингибирование реакции) необходимо провести повторный анализ пробы, начиная со стадии выделения ДНК.
- 9.2.** 100 мкл раствора выделенной согласно п.4. ДНК перенести в новую пробирку с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС» и провести всю процедуру выделения (п.п. 4.1. - 4.4) , постановки ПЦР (п.п. 5.1. - 5.10) и анализа результатов (п.п. 6.1. - 6.8) заново.
- 9.3.** Если процедура повторной обработки и анализа пробы, не приводит к появлению полосы ВК или ПК, рекомендуется повторное взятие биоматериала у пациента.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ и ТРАНСПОРТИРОВКИ РЕАГЕНТОВ

- 10.1.** Комплект «Набор для выделения ДНК/РНК из сыворотки или плазмы крови» должен храниться при +2...+8°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства). Допускается хранение и транспортировка этого комплекта при комнатной температуре не более 2 суток.
- 10.2.** Комплекты для проведения амплификации (отдельные компоненты) должны храниться при температуре минус 18-25°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства). Допускается хранение и транспортировка этого комплекта при температуре не выше 0°C не более 2,5 суток.
- 10.3.** Комплекты для проведения амплификации формата One Step должны храниться при температуре от +2...+8°C. Срок хранения —3 месяца с даты производства.
- 10.4.** Комплект для электрофоретической детекции №1, агароза, 50xTAE-буфер и раствор бромистого этидия может храниться при комнатной температуре в течение всего срока годности (указан на этикетке).
- 10.5.** Комплект для электрофоретической детекции №2 и готовые агарозные гели должны храниться при +2...+8°C в течение всего срока годности (6 месяцев с даты производства).

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение методики проведения исследования.

По вопросам, касающимся качества наборов реагентов, следует обращаться в НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1, стр.3, телефон/факс: (495) 589-14-03; e-mail: info@lytech.ru