

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный санитарный врач  
Российской Федерации

\_\_\_\_\_ Г.Г. Онищенко  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 200 г.

# ИНСТРУКЦИЯ

## по применению тест-системы

### «АмплиСенс® SARS»

для выявления РНК коронавируса, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «АмплиСенс® SARS» предназначена для выявления РНК коронавируса, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС, SARS), в клиническом материале методом обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием внутреннего РНК контроля (ВКО РНК). Тест-система рассчитана на 100 постановок, включая контрольные образцы.

#### ОПИСАНИЕ И ФОРМА ВЫПУСКА

Тест-система состоит из четырёх комплектов реагентов:  
комплект № 1 – «РИБО-сорб-SARS» для выделения РНК;  
комплект № 2 – «РЕБЕРТА-L-SARS» для получения кДНК на матрице РНК;  
комплект № 3 – «АмплиСенс-100-R» для амплификации участка кДНК (проведения ПЦР);  
комплект № 4 – «ЭФ-200» для электрофоретического анализа амплифицированной кДНК.

**Комплект № 1 – «РИБО-сорб-SARS» для выделения РНК\*:**

<i>Реактив</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во (шт)</i>
Лизирующий раствор	60	1
Раствор для отмывки	40	1
Этанол 70%	100	1
Ацетон	20	2
Сорбент	1,25	2
РНК-элюент (хранить при минус 20°C)	0,5	10
ОКО (отрицательный контрольный образец)	1,6	6
ПКО SARS-rec (положительный контрольный образец)	0,03	10
ВКО SARS-rec (внутренний контрольный образец)	0,06	10

\* - Комплект рассчитан на выделение РНК из 100 проб, включая контрольные (на каждые 10 клинических проб ставится по 1 положительному и 1 отрицательному контролю выделения).

**Комплект № 2 – «РЕВЕРТА-L-SARS» для получения кДНК:**

<i>Реактив</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во (шт)</i>
<b>RT-mix</b> лиофилизированная	--	<b>10</b>
<b>РНК-элюент SARS</b>	<b>0,07</b>	<b>10</b>
<b>Ревертаза (M-MLV)</b>	<b>0,06</b>	<b>1</b>
<b>ДНК-буфер</b>	<b>1,0</b>	<b>2</b>

Комплект рассчитан на 120 реакций обратной транскрипции, включая контрольные.

**Комплект № 3 – «АмплиСенс-100-R» для амплификации участка кДНК:**

<i>Реактив</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во (шт)</i>
<b>ПЦР-смесь-1</b> раскапана под воск в пробирки 0,5 (0,2) мл	<b>0,01</b>	<b>110</b>
<b>ПЦР-смесь-2 red</b>	<b>1,2</b>	<b>2</b>
<b>Минеральное масло</b>	<b>4,0</b>	<b>1</b>
<b>ПКО кДНК SARS</b>	<b>0,4</b>	<b>1</b>
<b>ДНК-буфер</b>	<b>1,0</b>	<b>1</b>

Комплект рассчитан на 110 реакций амплификации, включая контрольные.

**Комплект № 4 – «ЭФ-200» - для анализа продуктов ПЦР:**

<i>Реактив</i>	<i>Объем (мл) Масса (г)</i>	<i>Кол-во (шт)</i>
<b>Концентрированный ТБЕ с бромидом этидия</b>	<b>50 мл</b>	<b>1</b>
<b>Агароза для электрофореза</b>	<b>1,7 г</b>	<b>2</b>

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

## СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Материалом для исследования служат: смывы из носо- и ротоглотки, мазки из носо- и ротоглотки, образцы фекалий и плазма крови.

Клинический материал начинают собирать, по возможности, в более ранние сроки заболевания. При отрицательных результатах исследования необходимо проведение повторных исследований в динамике.

### Забор смывов из носоглотки.

Забор материала производят в положении больного сидя с отклоненной назад головой. Для получения смыва из полости носа в оба носовых хода с помощью зонда или распылителя Смирнова последовательно вводят по 3-5 мл теплого стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Промывную жидкость собирают через воронку в стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без автоклавирования.

### Забор смывов из ротоглотки.

Перед забором смывов из ротоглотки проводят предварительное полоскание полости рта водой. После этого проводят тщательное полоскание ротоглотки 8-10 мл изотонического раствора натрия хлорида. Жидкость собирают через воронку в стерильную пробирку. Не допускается повторное использование воронки без автоклавирования.

### Взятие мазков из носо- и ротоглотки.

#### *Мазки из полости носа.*

Мазки (слизь) берут сухими стерильными ватными тампонами. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем тампон

слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа.

После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду вращают зонд в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку.

#### *Мазки из ротоглотки.*

Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки.

После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду вращают зонд в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку.

Вышеперечисленные виды материала могут храниться до проведения исследования в течение суток при температуре плюс 4°C или 1 неделю - при температуре минус 20°C.

Пробы фекалий – забирают из предварительно продезинфицированного стерильного горшка или подкладного судна. Пробу в количестве примерно 1 грамма (1 мл) отдельным наконечником с аэрозольным барьером или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный флакон.

При исследовании образцов нативных фекалий без предшествующего замораживания готовят фекальную суспензию (при водянистой консистенции фекалий в виде прозрачной жидкости фекальная суспензия не готовится).

#### *Приготовление фекальной суспензии.*

1. В соответствующее пробам количество микроцентрифужных пробирок (объемом 1,5 мл) вносят 800 мкл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида).

2. В каждую пробирку отдельным наконечником с аэрозольным барьером (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г (100 мкл) фекалий и тщательно ресуспендируют до образования гомогенной суспензии.

При невозможности исследования материала в течение суток и/или необходимости длительного хранения к 10-20%-й суспензии фекалий в фосфатном буфере (или стерильном изотоническом растворе натрия хлорида) добавляют глицерин в конечной концентрации 10-15%. Подготовленные таким образом пробы замораживают только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30-40 минут.

#### *Для выявления вирусных агентов следует приготовить осветленный экстракт фекалий.*

Для приготовления осветленного экстракта фекалий используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию с глицерином, подвергавшуюся замораживанию.

1. Взвесь фекалий интенсивно гомогенизируют на вортексе.

2. Осветляют полученную суспензию путем центрифугирования в течение 5 мин при 12 тыс. об./мин.

Супернатант (100 мкл) смешивают с ОКО (100 мкл) и используют непосредственно для выделения РНК. При необходимости хранения осветленный экстракт фекалий отбирают в одноразовую пробирку и замораживают.

Допускается хранение образцов нативных фекалий при температуре плюс 2-8°C в течение 1 суток. Фекальная суспензия с глицерином и осветленный экстракт фекалий хранятся при температуре минус 20°C в течение 1 недели, при температуре минус 70°C – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

#### Получение плазмы крови.

Забор крови производится натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл или специальную вакуумную систему типа «Venoject» (с ЭДТА), «Vacuett®» (сиреневые крышки – 6% ЭДТА). При заборе в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносится 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 антикоагулянта использовать нельзя!** Пробирка закрывается крышкой и переворачивается несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом). Плазму крови получают центрифугированием цельной крови при 3000 об./мин. в течение 20 мин. Затем отбирают плазму отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл. Для выделения РНК используется 200 мкл образца плазмы.

Хранить плазму крови можно не более 3 суток при 2-8°C, в течение 1 месяца – при температуре минус 20°C, в течение 1 года – при температуре минус 70°C. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. При замораживании клинического материала его транспортировка должна проводиться в замороженном состоянии.

### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Исследования материала от больного, подозрительного на заражённость вирусом SARS, методом ПЦР проводят в учреждениях, имеющих разрешение на работу с ПБА I-II групп патогенности (в соответствии с СП 1.2.011-94).

2. Для проведения генодиагностических исследований выделяют четыре отдельные комнаты, предназначенные для выполнения следующих этапов ПЦР-анализа:

- 1) первичная подготовка, выделение РНК;
- 2) постановка реакции обратной транскрипции (синтез кДНК) и проведение ПЦР;
- 3) учет результатов реакции амплификации;
- 4) приготовление реакционных смесей для реакции обратной транскрипции и ПЦР (чистое помещение).

Комнаты «1», «2», «3» укомплектовываются емкостями с дезинфицирующим средством и баками для автоклавирования.

3. Помещение «1» должно быть оборудовано боксирующим устройством (боксом биологической безопасности). В боксе размещают поддон для разбора и первичной подготовки проб с салфеткой, смоченной 6% раствором перекиси водорода, оборудование для выделения РНК: микроцентрифугу, вортекс, твердотельный термостат. В этой комнате находится низкотемпературный холодильник для хранения нативного материала. В помещении «2» расположен амплификатор для проведения реакции обратной транскрипции и постановки ПЦР. В помещении «3» находится оборудование для проведения электрофореза, учета и документирования результатов (источник тока, камера для электрофореза, трансиллюминатор с устройством для документирования результатов электрофореза и поддон с салфеткой, смоченной 6 % раствором перекиси водорода.

4. Подготовку реакционных смесей для реакции обратной транскрипции и ПЦР осуществляют в отдельном «чистом» помещении «4». Пробирки с приготовленными реактивами передают в комнаты «1» и «2» для внесения в них исследуемых проб.

5. Каждое помещение должно иметь свой набор автоматических пипеток, наконечников (с фильтрами), пластиковой и стеклянной посуды, используемых только в данной комнате (боксе) и имеющих соответствующую маркировку. Наконечники должны строго соответствовать автоматическим пипеткам, пробирки для амплификации - термоциклерам (в соответствии с инструкцией фирмы-производителя прибора).

6. Аптечка дополнительно комплектуется: 1% раствором борной кислоты, интерфероном.

## **МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА (с указанием фирм-производителей или поставщиков):**

### **Для выделения РНК из клинического материала - ЗОНА 1:**

1. Настольный бокс с бактерицидной лампой («Циклотемп» СП «РТС») или стерильный ламинарный шкаф (БОВ-001-АМС, г. Миасс);
2. Твердотельный термостат для пробирок типа «эппендорф» на 25 – 100°C («Биоком»);
3. Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой («ОМ-1», г. Ульяновск);
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф» до 16 тыс. g («Elmi», «Hettish», «Eppendorf»);
5. Центрифуга/вортекс «Micro-Spin», «Minigen» («Биоком»);
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет»);
7. Одноразовые полипропиленовые пробирки с закручивающимися или плотно закрывающимися крышками на 1,5 мл («QSP», «Sarstedt»);
8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с **аэрозольным барьером** до 200 и до 1000 мкл («QSP»);
9. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 мкл («Ленпипет», «QSP»);
10. Штативы для наконечников, микропробирок на 1,5 мл («Ленпипет», «Хеликон»);
11. Холодильник на 2-8°C и на минус 20°C;
12. Емкость с дезинфицирующим раствором;
13. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.

### **Для проведения обратной транскрипции и амплификации (ПЦР) - ЗОНА 2:**

1. Настольный бокс с бактерицидной лампой («Циклотемп» СП «РТС») или стерильный ламинарный шкаф («БОВ-001-АМС», г. Миасс);
2. Амплификатор («Терцик» (ДНК-технология); «GeneAmp PCR System 2400», «GeneAmp PCR System 2700» (Perkin Elmer); Biometra);
3. Одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации на 0,5 (0,2) мл («QSP»);
4. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с **аэрозольным барьером** до 100 мкл, свободные от РНКаз («QSP»);
5. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема («Ленпипет»);
6. Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 (0,2) мл («Ленпипет», «Хеликон»);
7. Холодильник на минус 20 °С для хранения реактивов, РНК или кДНК;
8. Емкость для сброса наконечников;
9. Комплект средств для обработки рабочего места;
10. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.

### **Для электрофоретического анализа продуктов ПЦР - ЗОНА 3:**

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», ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ, Россия; «BioRad», США);
5. Аквадистиллятор;
6. Холодильник на 2-8°C 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 литров для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия;
14. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.

## ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### Описание этапов ПЦР-анализа

ПЦР-анализ состоит из четырех этапов:

1. выделение РНК;
2. получение комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК – реакция обратной транскрипции (ОТ);
3. амплификация участка ДНК – полимеразная цепная реакция (ПЦР);
4. электрофоретический анализ продуктов ПЦР и учет результатов ПЦР-анализа.

### ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ РНК/ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОБ

Проводится в ЗОНЕ-1 -комнате для обработки клинического материала

#### Порядок работы.

1. **Лизирующий раствор и раствор для отмывки** (если они хранились при температуре 2-8°C) прогреть при 60–65°C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный и положительный контроли выделения). Внести в каждую пробирку по **5 мкл** внутреннего контрольного образца (**ВКО SARS-rec**), затем добавить по **600 мкл** лизирующего раствора. Промаркировать пробирки.
3. Если анализируются **пробы плазмы крови, мазки из носо- и ротоглотки**, то в пробирки с лизирующим раствором и **ВКО** внести по **200 мкл** исследуемого образца, используя наконечники с аэрозольным барьером.
4. Если анализируются **пробы фекалий, смывы из носо- и ротоглотки**, то в пробирки с лизирующим раствором и **ВКО** внести по **100 мкл** **ОКО** и по **100 мкл** исследуемого образца, используя наконечники с аэрозольным барьером.
5. В пробирку отрицательного контроля (**ОК**) выделения внести **200 мкл** отрицательного контрольного образца (**ОКО**). В пробирку положительного контроля (**ПК**) выделения внести **180 мкл** **ОКО** и **20 мкл** положительного контрольного образца (**ПКО SARS-rec**).
6. Плотно закрытые пробы тщательно перемешать на вортексе и процентрифугировать в течение 2 мин. при 10 тыс. об./мин. на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки пробирки.
7. Тщательно ресуспендировать **сорбент** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного **сорбента**. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 1 мин, еще раз перемешать и оставить на 5 мин.
8. Процентрифугировать пробирки для осаждения сорбента при 10 тыс. об./мин. в течение 1 мин. на микроцентрифуге. Удалить супернатант, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Добавить в пробирки по **400 мкл** раствора для отмывки. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, процентрифугировать 1 мин. при 10 тыс. об./мин. на микроцентрифуге. Удалить супернатант, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
10. Добавить в пробирки по **500 мкл 70% этанола**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе. Процентрифугировать 1 мин. при 10 тыс. об./мин. на микроцентрифуге. Удалить супернатант, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
11. Повторить отмывку **этанолом**, следуя пункту 10.
12. Добавить в пробирки по **400 мкл** **ацетона**. Тщательно ресуспендировать сорбент на вортексе, процентрифугировать 1 мин. при 10 тыс. об./мин. на микроцентрифуге. Полностью удалить супернатант из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
13. Поместить пробирки в термостат при температуре 60°C на 5-10 мин. для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
14. В пробирки добавить по **40 мкл РНК-элюента**, используя свободный от РНКаз наконечник с аэрозольным барьером. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 60°C на 5 мин. Перемешать на вортексе и процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах микроцентрифуги (12-13 тыс. об./мин.) в течение 2 мин.

Супернатант содержит очищенные РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Реакцию обратной транскрипции следует проводить сразу после получения РНК-пробы. Отбирать раствор РНК для реакции нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Очищенный препарат РНК может храниться до 4 часов при температуре 2-8°C. Для длительного хранения препарата необходимо, не захватывая сорбент, отобрать раствор РНК, перенести в стерильную пробирку и хранить при температуре минус 70°C в течение года.

## **ЭТАП 2. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР**

**Проводится в ЗОНЕ 2 - комнате для подготовки и проведения амплификации (ПЦР)**

### **ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ (Общий объем реакции - 20 мкл, объем РНК-пробы – 15 мкл)**

#### **Порядок работы:**

**Внимание!** При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

1. Отобрать необходимое количество микропробирок на 0,5 (0,2) мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с **лиофилизированной RT-mix**, добавить 65 мкл **РНК-элюента SARS** и тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
3. К полученному раствору добавить 6 мкл **ревертазы**, перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
4. Внести в микропробирки по **5 мкл** готовой реакционной смеси.
5. Используя наконечник с барьером, добавить **15 мкл РНК-пробы** в пробирку с реакционной смесью. Осторожно перемешать.
6. Поставить пробирки в амплификатор (термостат) на 37°C на 30 минут.
7. Полученную в реакции обратной транскрипции кДНК для последующей постановки ПЦР развести в 2 раза ДНК-буфером (к 20 мкл кДНК отдельным наконечником добавить 20 мкл ДНК-буфера, аккуратно перемешать пипетированием 10 раз).

**Готовый препарат кДНК можно хранить при температуре минус 20°C в течение недели или при температуре минус 70°C в течение года.**

### **ПОСТАНОВКА ПЦР (Общий объем реакции - 50 мкл, объем кДНК-пробы – 20 мкл)**

Во всех комплектах для амплификации семейства АмплиСенс обязательно применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при 95°C, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

#### **Подготовка пробирок для проведения ПЦР.**

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1 и воском для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по **20 мкл ПЦР-смеси-2 («верхней»)**, при этом ПЦР-смесь-2 не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1.
3. Сверху добавить по капле **масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).

#### **Порядок работы.**

1. Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольными барьерами, внести по **20 мкл кДНК, полученных в реакции обратной транскрипции РНК**.
2. Две дополнительные пробирки предназначены для **контролей этапа ПЦР** (см. ниже):

- а) **отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в подготовленную пробирку 20 мкл ДНК-буфера;
- б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку 20 мкл положительного контрольного образца **ПКО кДНК SARS**.
3. Запустить на амплификаторе нужную программу (см. таблицу 1):

Таблица 1.

## Программы для амплификации участка кДНК SARS

цикл	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке): “GeneAmp PCR System 2400” (Perkin Elmer), «Терцик» (ДНК-технология)			Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке): “GeneAmp PCR System 2700” (Perkin Elmer)			Амплификаторы с матричным регулированием температуры: «Biometra»		
	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
1	95°C	пауза		93°C	пауза		95°C	пауза	
2	95°C	5 минут	1	93°C	5 минут	1	95°C	5 минут	1
3	95°C	10 секунд	42	93°C	10 секунд	42	95°C	30 секунд	42
	63°C	20 секунд		65°C	40 секунд		63°C	45 секунд	
	72°C	20 секунд					72°C	45 секунд	
4	72°C	2 минуты	1	72°C	2 минуты	1	72°C	2 минуты	1
5	10°C	хранение		10°C	хранение		10°C	хранение	

4. Когда температура в ячейке амплификатора достигнет 95°C (93°C – при использовании амплификатора «GeneAmp PCR System 2700», Perkin Elmer) поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы. При работе с амплификаторами «GeneAmp PCR System 2400», «GeneAmp PCR System 2700», Perkin Elmer, пауза устанавливается вручную.
- Время амплификации на амплификаторе с регулированием температур по матрице примерно 2 ч, на амплификаторе с активным регулированием: «Терцик» – 2 ч 10 мин, «GeneAmp PCR System 2400», «GeneAmp PCR System 2700» – 1 ч 30 мин.
5. После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в комнату для анализа продуктов ПЦР (**ЗОНУ 3**). Пробы после амплификации можно хранить 16 часов при комнатной температуре, в течение недели - при 2-8°C (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

### 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 концентрированного ТБЕ**, 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. пункт «Обезвреживание»).

2. **Агарозу** 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 минуты.



Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 минут. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 минуты (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до 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 минут 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 положительному. 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 **K+** 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») и источника питания «Эльф-4» («ДНК-технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18-20 минут. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.
3. По завершении времени электрофореза (краситель ксиленцианол при этом пройдет примерно половину длины геля – 1,5 см; краситель крезоловый красный – примерно 2/3 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 специальной маской или стеклянной пластиной!**

## УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

**Длина специфических амплифицированных фрагментов кДНК:**  
**коронавируса SARS – 221 п.н., внутреннего контрольного образца (ВКО) – 400 п.н.**

**Таблица 2.**

**Оценка результатов анализа контрольных точек**

Контрольная точка	Какой этап ПЦР-анализа контролируется	Специфические полосы на электрофореграмме	
		Полоса 221 п.н.	Полоса 400 п.н.
ПК	Выделение РНК	<b>Есть</b>	<b>Есть</b>
ОК	Выделение РНК	Нет	<b>Есть</b>
К-	ПЦР	Нет	Нет
К+	ПЦР	<b>Есть</b>	Нет

- 1. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа выделения (ПК),** должны быть две яркие светящиеся оранжевые полосы: специфическая – на уровне **221 п.н.** и полоса внутреннего контрольного образца SARS – на уровне **400 п.н.**
- 2. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа выделения (ОК),** должна быть только полоса ВКО на уровне **400 п.н.**
- 3. В дорожке, соответствующей положительному контролю этапа ПЦР (К+),** должна быть яркая специфическая светящаяся оранжевая полоса на уровне **221 п.н.**
- 4. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К-) не должно** быть никаких полос.
- 5. Положительными считаются образцы,** которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне **221 п.н.** большей или меньшей интенсивности, независимо от наличия или отсутствия полосы внутреннего контрольного образца. Полоса внутреннего контрольного образца может отсутствовать в пробах с высокой концентрацией РНК коронавируса-SARS.
- 6. Отрицательными считаются образцы,** которые содержат только полосу **400 п.н.** большей или меньшей интенсивности
- Кроме полос **221 п.н.** и **400 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:**

- Если результаты анализа контрольных точек не совпадают с приведенными в таблице 2, то соответствующий этап анализа следует переделать.
- Если в дорожке какой-либо из исследуемых проб отсутствуют обе полосы, и 221 п.н. и 400 п.н., результат анализа по данной пробе считается недействительным, необходимо повторить исследование этой клинической пробы с самого начала. Причиной могла явиться ошибка в процедуре обработки клинического материала, приведшая к потере РНК или ингибированию ОТ и/или ПЦР.
- В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.
- Появление специфической полосы 221 п.н. в любом из отрицательных контрольных образцов (ОК, К-) указывает на контаминацию реактивов или проб. В этом случае результаты анализа считают недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

### ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕ

1. Обезвреживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсосов на 20-24 час в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 10% раствор хлорной извести или 5% раствор хлорамина Б.
2. Агарозу и электрофорезный буферный раствор помещают в отдельный контейнер, 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 часов. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

**ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ.** При температуре от 2 до 20°C в течение суток (кроме комплекта №2). Комплект №2 транспортировать при минус 20°C или в термосе со льдом в течение суток.

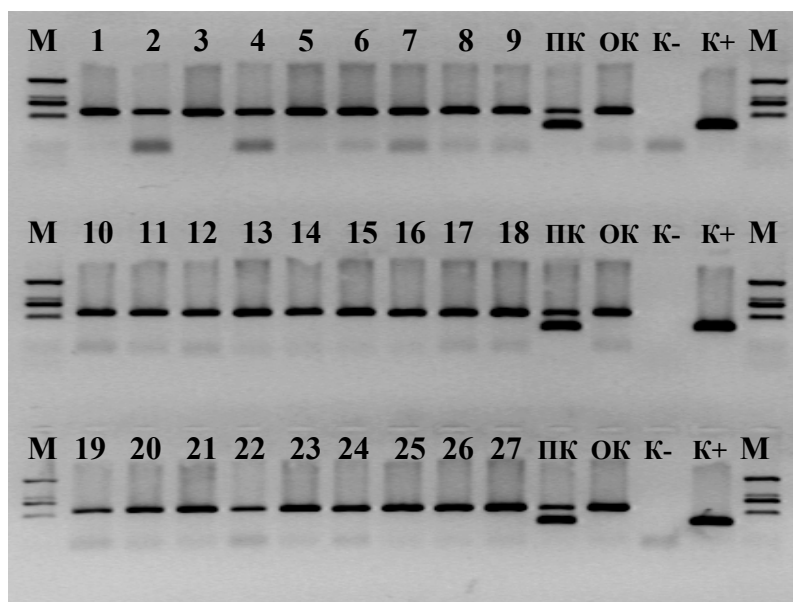
**ХРАНЕНИЕ.** Комплекты №1 (кроме РНК-элюента) и №3 хранятся при температуре от 2 до 8°C. Комплект №2 и РНК-элюент хранятся при температуре минус 20°C. Комплект №4 хранится при температуре от 18 до 25°C в темном месте.

**СРОК ГОДНОСТИ.** 6 месяцев.

Рекламации на качество тест-системы для выявления РНК коронавируса, вызывающего ТОРС, методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции «АмплиСенс® SARS» направлять в адрес ГИСК им. Л.А.Тарасевича (121002 г. Москва, Сивцев Вражек, 41, т. 241-39-22) и по адресу предприятия-изготовителя.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

к инструкции по применению тест-системы «АмплиСенс® SARS».



**Рисунок 1.** Оценка специфичности тест-системы при тестировании клинического материала.

Обозначения:

1-9 – мазки мазков из ротоглотки;

10-18 – образцы плазмы крови;

19-27 – образцы фекальных экстрактов;

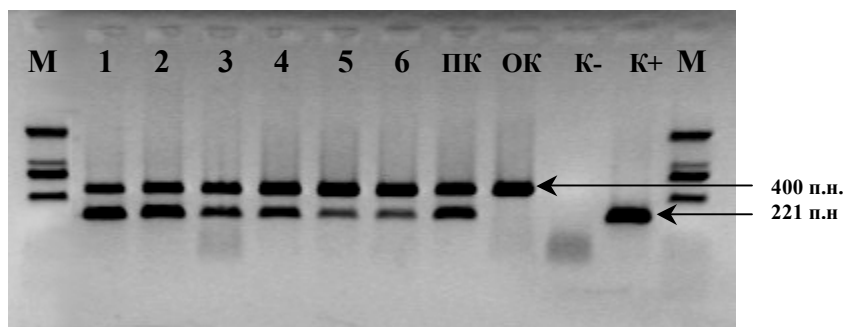
ПК – Положительный контроль выделения РНК;

ОК – отрицательный контроль выделения РНК;

К- – Отрицательный контроль ПЦР;

К+ – Положительный контроль ПЦР;

М – маркер молекулярных масс ДНК – 1200 п.н., 670 п.н., 550 п.н., 345 п.н..



**Рисунок 2.** Оценка аналитической чувствительности тест-системы в мазках из ротоглотки с использованием стандартного образца предприятия (положительного контрольного образца РНК CoV-SARS-rec).

Обозначения:

1 – образец, содержащий РНК CoV-SARS-rec в концентрации  $1,8 \times 10^5$  ГЭ/мл;

2 – образец, содержащий РНК CoV-SARS-rec в концентрации  $6 \times 10^4$  ГЭ/мл;

3 – образец, содержащий РНК CoV-SARS-rec в концентрации  $2 \times 10^4$  ГЭ/мл;

4 – образец, содержащий РНК CoV-SARS-rec в концентрации  $6,7 \times 10^3$  ГЭ/мл;

5, 6 – образцы, содержащие РНК CoV-SARS-rec в концентрации  $2,2 \times 10^3$  ГЭ/мл;

ПК – Положительный контроль выделения РНК;

ОК – отрицательный контроль выделения РНК;

К- – Отрицательный контроль ПЦР;

К+ – Положительный контроль ПЦР;

М – маркер молекулярных масс ДНК – 1200 п.н., 670 п.н., 550 п.н., 345 п.н..