

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г № _____

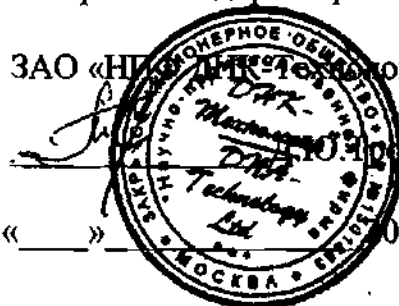
УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «НПО «ДНК-Технология»

«____» _____ 2010 г. Профимов

«____» _____ 2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПЦР АМПЛИФИКАЦИИ ДНК ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1 И 2 ТИПОВ, ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА (HSV1/HSV2/CMV) В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Комплект реагентов (HSN1/HSV2/CMV) предназначен для одновременного выявления ДНК Cytomegalovirus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2 в биологическом материале человека (соскоб из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, моча) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1.2. Набор может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

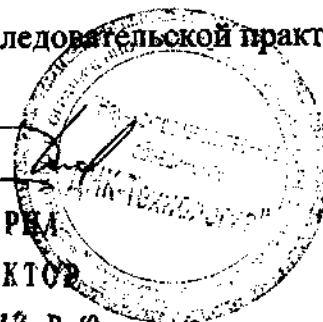
Принцип анализа, применённый в наборе реагентов (HSN1/HSV2/CMV)

основан на использовании процесса амплификации (умножения) ДНК методом

КОПИЯ ВЕРНА

ГЕН. ДИРЕКТОР

ДМИТРОВСКИЙ В.Ю.



циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей Taq-полимеразой.

Для оценки прохождения ПЦР в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК).

В наборе предусмотрен способ детекции продуктов амплификации в режиме реального времени («Real-time»). Для детекции продуктов амплификации в смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется детектирующим амплификатором (ДТ-96, ООО «НПО ДНК-Технология»).

Использование специфичных ДНК-зондов позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации фрагментов геномов *Chl. trachomatis*, *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae* и внутреннего контрольного образца (ДНК-мишеней).

ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации фрагментов геномов Cytomegalovirus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2 и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными красителями, детектирующимися на каналах Cy5, FAM, ROX и HEX соответственно.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь

происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

2.2 СОСТАВ НАБОРА

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок;
- раствор Таq-полимеразы мульти, по 500 мкл 2 пробирки;
- минеральное масло, по 1,0 мл 2 пробирки;
- положительный контрольный образец «К+», 150 мкл 1 пробирка.

В состав смеси для амплификации входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, внутренний контрольный образец, флуоресцентные ДНК-зонды.

Время проведения анализа - 2 ч.

Набор рассчитан на проведение 96 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНАЛИЗА

В образцах биологического материала человека, содержащих ДНК Cytomegalovirus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат по соответствующему каналу детекции.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК Cytomegalovirus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, детектирующий амплификатор

должен регистрировать отрицательный результат по соответствующим каналам детекции.

ВНИМАНИЕ! При высокой первоначальной концентрации ДНК одного из определяемых возбудителей возможно получение ложноотрицательного результата для возбудителя, чья ДНК присутствует в низкой концентрации (см. п. 9 «Учёт результатов реакции»).

3.2 АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Аналитическая чувствительность на 1 мл образца:

2000 геном-эквивалентов ДНК *Cytomegalovirus* или

2000 геном-эквивалентов ДНК *Herpes Simplex Virus 1* или

2000 геном-эквивалентов ДНК *Herpes Simplex Virus 2*.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.2 Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

4.3 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки без талька.

4.5 При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.6 Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.7 Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или в ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком. Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

4.9 Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.10 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.11 Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.2.731-99. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

4.12 Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3. 2569 -09.

При работе с набором реагентов (NSV1/NSV2/CMV) требуются следующие оборудование и материалы:

- детектирующий амплификатор ДТ-96 производства ООО «НПО ДНК-Технология»;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный на 65 °С или 50 °С;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объёмом 1-20 мкл;
- одноразовые перчатки резиновые;

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту для выделения ДНК из биологического материала

Рекомендуемые комплекты для выделения: «ПРОБА-РАПИД», «ПРОБА-ГС»/«ПРОБА-ГС-ПЛЮС», «ПРОБА-НК»/«ПРОБА-НК-ПЛЮС» производства ООО «НПО ДНК-Технология». О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки.

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

7.2.1. Промаркировать необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, с учетом пробирок для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-»..

7.2.2. Во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.

7.2.3. В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.

7.2.4.Внести в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»).

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить препараты ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

7.2.5.В пробирку, промаркированную «К-», внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1), а в пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца..

7.2.6.Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3-5 с.

7.2.7.Установить все пробирки в блок амплификатора.

7.2.8.Выбрать «Тест», используемый для данного набора (HSN1/HSV2/CMV) указать количество образцов, указать идентификатор образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, провести ПЦР (с учетом объема смеси для амплификации, равного 35 мкл). При выборе теста в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведенная в таблице 1.

Внимание! Специфика «С» должна быть отмечена на каналах Fam, Rox и Cy5, а внутренний контроль «ВК» – на канале Hex .

Таблица 1. Программа амплификации

№ блока	Температура °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	1	00	1		цикл
	94,0	1	30			

2	94,0	0	30	5		цикл
	64,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		цикл
	64,0	0	15		√	
4	94,0	0	15	1		цикл
5	10,0			хранение		хранение

Продукты амплификации можно хранить при температуре 2-8 °С в течение 5 суток.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА ДТ-96

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-96). ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации ДНК-мишеней *C. trachomatis*, *T.vaginalis*, *N. gonorrhoeae* и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными красителями, детектируемыми на каналах Cy5, Fam, Rox и Hex соответственно.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.

9.2. В биологических образцах, содержащих ДНК одного или нескольких патогенов (HSV1/ HSV2/ CMV,), детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции на соответствующих каналах (Cy5, FAM, ROX).

ВНИМАНИЕ! Если в препарате биологического образца регистрируется рост флуоресценции специфического продукта на каналах Fam, Rox или Cy5 раньше 24 цикла по Cp (Cp менее 24), то это говорит о высокой первоначальной концентрации ДНК соответствующего возбудителя. В данном случае возможно получение ложноотрицательного результата для возбудителя, чья ДНК присутствует в низкой концентрации. В этом случае рекомендуется повторно провести ПЦР выделенного препарата с использованием комплектов реагентов для ПЦР-амплификации ДНК Cytomegalovirus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2 производства ООО «НПО ДНК-Технология».

9.3. В биологических образцах, не содержащих ДНК определяемых возбудителей, и в отрицательном контрольном образце детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Hcx (внутренний контрольный образец), рост флуоресценции по каналам Fam, Rox и Cy5 отсутствует.

9.4. Внутренний контрольный образец (канал Hcx) определяется в биологических образцах, положительном контрольном образце и

отрицательном контрольном образце. При высокой первоначальной концентрации какой-либо специфичной ДНК-мишени в биологических образцах рост уровня флуоресценции на канале Нех может не регистрироваться.

9.5.Результат оценивается программой как недостоверный (нд) в случае отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфичного продукта (по каналам Fam, Rox или Cy5) и для внутреннего контрольного образца (по каналу Нех).

Недостоверный результат может быть вызван присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторная постановка амплификации препарата ДНК, повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.6.При отсутствии положительного результата (экспоненциального роста флуоресценции по каналам Fam, Rox или Cy5) в положительном контрольном образце результаты всей постановочной серии бракуют.

9.7.При наличии положительного результата (экспоненциального роста флуоресценции по каналам Fam, Rox или Cy5) в отрицательном контрольном образце (К-), результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1.Срок годности набора – 6 мес.

10.2.Набор следует хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

10.3.Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.

10.4.Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.5.Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу:

117587, Москва, Варшавское ш., д. 125ж, к.6, этаж 11,

телефон/факс (495) 980-45-55 .

Ведущий научный сотрудник

ЗАО «НПФ ДНК-Технология»,

кандидат биологических наук



Е.В.Гончарова

«__» _____ 2010 г

Пронумеровано и прошнуровано

12 (*Решение*)
специалист по регистрации

Ребрикова О.В.