

«УТВЕРЖДАЮ»

**Генеральный директор
ООО «Альфалаб»**

 **М.А.Суворова**
«*ИС*» *рекадр* 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

**для выявления ДНК *Trichomonas vaginalis* в клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной
детекцией в режиме реального времени**

«Трихомонас вагиналис»

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	3
2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ.....	3
2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА	3
2.2. ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
2.3. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ.....	4
2.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
4. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ.....	6
5. ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.....	8
6. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	8
6.1. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА.....	8
6.2. ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ.....	8
6.3. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	9
6.4. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	9
7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА.....	11
8. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ.....	11
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	12
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	12

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Трихомонас вагиналис» предназначен для качественного обнаружения ДНК *Trichomonas vaginalis* в образцах биоматериала человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме реального времени.

Набор предназначен для выявления ДНК *Trichomonas vaginalis* – возбудителя урогенитального трихомониаза - наиболее распространенной инфекции, передаваемой половым путем (ИППП). *Trichomonas vaginalis* - простейший одноклеточный паразит.

Материалом для исследования являются мазки из урогенитального тракта человека.

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика, научные исследования. Только для исследований *in vitro*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ образцов включает следующие этапы:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК из образцов клинического материала);
2. Амплификация специфических фрагментов ДНК в ходе ПЦР-реакции;
3. Детекция продуктов амплификации в режиме реального времени.

В процессе реакции происходит амплификация фрагмента ДНК *Trichomonas vaginalis* (при условии наличия указанного микроорганизма в исходном клиническом материале) и амплификация фрагмента гена β -глобина человека (что служит в качестве контроля взятия биологического материала). Для амплификации специфического участка ДНК используются олигонуклеотиды и флуоресцентно меченные олигонуклеотидные зонды Taqman. В присутствии фермента Taq-полимеразы происходит гибридизация олигонуклеотидов и зонда с комплементарным участком ДНК-мишени. Образование специфического продукта амплификации сопровождается отщеплением флуоресцентной метки (благодаря наличию у Taq-полимеразы 5'-экзонуклеазной активности) и появлением детектируемого флуоресцентного сигнала, регистрация которого проводится в режиме реального времени. Олигонуклеотидные зонды, используемые для детекции ДНК *Trichomonas vaginalis* и детекции фрагмента ДНК человека (внутренний контроль) имеют флуоресцентные метки с разными спектрами поглощения и испускания, что позволяет проводить одновременную регистрацию флуоресценции по двум каналам (FAM и HEX). Интенсивность

флуоресценции прямо пропорциональна количеству продуктов амплификации и, следовательно, нарастает с каждым последующим циклом.

Набор предназначен для использования на амплификаторах детектирующих для постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (MiniOpticon, BioRad; ДТ-96, ДНК-технология или другие амплификаторы с аналогичными техническими характеристиками).

2.2. ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов «Трихомонас вагиналис» выпускается в четырех различных вариантах комплектации, которые отличаются по количеству определений, на которое рассчитан набор (48/96), и типу пробирок со смесью для амплификации (пробирки/стрипы):

- 1) комплект на 48 определений, смесь для амплификации в пробирках;
- 2) комплект на 48 определений, смесь для амплификации в стрипах;
- 3) комплект на 96 определений, смесь для амплификации в пробирках;
- 4) комплект на 96 определений, смесь для амплификации в стрипах;

2.3. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

На 48 определений:

Компонент набора	Описание	Объем, мкл	Количество
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная жидкость	10,0	48 пробирок объемом 0,2 мл или 6 стрипов по 8 пробирок объемом 0,2 мл каждая
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная жидкость	300,0	2 пробирки объемом 0,6 мл
Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная жидкость	75,0	1 пробирка объемом 0,5 мл
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная жидкость	150,0	1 пробирка объемом 0,5 мл

Комплект на 48 определений позволяет провести анализ 48-ми образцов, включая положительный и отрицательный контрольные образцы.

На 96 определений:

Компонент набора	Описание	Объем, мкл	Количество
Смесь для амплификации	Прозрачная бесцветная жидкость	10,0	96 пробирок объемом 0,2 мл или 6 стрипов по 8 пробирок объемом 0,2 мл каждая
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная жидкость	300,0	4 пробирки объемом 0,6 мл
Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная жидкость	75,0	2 пробирки объемом 0,5 мл
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная жидкость	150,0	2 пробирки объемом 0,5 мл

Комплект на 96 определений позволяет провести анализ 96-ти образцов, включая положительный и отрицательный контрольные образцы.

2.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность. Нижний предел аналитической чувствительности набора реагентов - 1000 копий/мл. Для определения аналитической чувствительности используют контрольные образцы предприятия (КОП), представляющие собой полученные методом генной инженерии образцы плазмидной ДНК со встроенным фрагментом, специфичным для ДНК детектируемого микроорганизма. Концентрацию КОП-1 измеряют спектрофотометрически на приборе NanoDrop2000.

Аналитическая специфичность. Аналитическая специфичность набора «Трихомонас вагиналис» подтверждена отсутствием регистрации экспоненциального роста флуоресцентного сигнала по каналу FAM в отрицательных контрольных образцах.

Специфичность анализа при постановке теста с применением набора «Трихомонас вагиналис» доказана методом секвенирования продуктов амплификации и подтверждена отсутствием неспецифических перекрестных реакций при тестировании образцов ДНК человека и панели образцов ДНК микроорганизмов, являющихся представителями нормальной микрофлоры урогенитального тракта, условно-патогенной и патогенной флоры (*Lactobacillus* spp, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*).

Диагностическая чувствительность набора реагентов составляет не менее 98 % (при расчете по формуле Бернулли с доверительной вероятностью 90%) и подтверждается в ходе клинических испытаний на выборке клинических образцов.

Диагностическая специфичность набора реагентов рассчитывается на основе данных, полученных в ходе клинических испытаний на выборке клинических образцов; расчёт показателя производится по формуле Бернулли с доверительной вероятностью 90%.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 3.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).
- 3.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 3.3. Меры предосторожности - соблюдение правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».
- 3.4. Утилизация отходов производится в соответствии с СанПиН N2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», сбор отходов осуществляется в одноразовые пакеты желтого цвета, предназначенные для утилизации медицинских отходов класса Б (ГОСТ Р 50962-96).

4. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение ДНК из клинического материала

ВНИМАНИЕ! Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала не входит в состав набора

Для выделения ДНК из клинических образцов используются комплекты реагентов, рекомендованные для использования в клинической лабораторной диагностике при анализе мазков из урогенитального тракта («ДНК-сорб-АМ», ООО «Некст-Био», Россия), «ЭДЭМ», НТК «Диаэм», Россия) и другие аналогичные комплекты реагентов). Экстракцию ДНК проводят согласно инструкции производителя набора.

Необходимое оборудование:

- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 3000 – 12000 об/мин;

- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Термит (ООО НПФ «ДНК-технология», Россия), поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5 – 10; 20-200 мкл;
- емкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- контейнер с крышкой для дезинфицирующего раствора;
- отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки резиновые или пластиковые, одноразовые по МУ 1.3.2569-09.

2-й этап – проведение ПЦР-амплификации и детекция продуктов амплификации в режиме реального времени с помощью набора реагентов «Трихомонас вагиналис»

Необходимое оборудование:

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- штатив «рабочее место» для стрипованных и обычных пробирок объемом 0,2 мл;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5 – 10; 20-200 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки резиновые или пластиковые, одноразовые по МУ 1.3.2569-09;
- емкость для дезинфицирующего раствора для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующий раствор;
- термостат программируемый (амплификатор) для проведения ПЦР с детекцией флуоресценции по двум каналам FAM и HEX в режиме «реального времени».

5. ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала должно проводиться в строгом соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, 2012 г.

Материалом для исследования являются мазки из урогенитального тракта человека. Максимальный срок хранения образцов биоматериала не более 24 часов при 4 - 8°C.

6. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции (выделения) ДНК из клинических образцов используются комплекты реагентов, рекомендованные для использования в клинической лабораторной диагностике («ДНК-сорб-АМ», ООО «Некст-Био», Россия; «ЭДЭМ», НТК «Диаэм», Россия и другие аналогичные комплекты реагентов). Экстракцию ДНК проводят согласно инструкции, прилагаемой к набору для выделения ДНК.

6.2. ПЦР-АМПЛИФИКАЦИЯ

Общий объём реакционной смеси – 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 5 мкл.

6.2.1. В штатив поставить необходимое количество пробирок/стрипов со смесью для амплификации (в соответствии с количеством проб и две пробирки для ПКО и ОКО);

6.2.2. В каждую пробирку, не повреждая слой воска, внести по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Таq-полимеразы;

6.2.3. Закрыть крышки пробирок;

6.2.4. Поочередно открывая крышки пробирок внести в пробирки:

6.2.4.1. В одну из подготовленных пробирок внести 5 мкл ОКО;

6.2.4.2. В пробирки, предназначенные для анализа образцов, поочередно внести по 5 мкл анализируемых проб;

6.2.4.3. В оставшуюся пробирку внести 5 мкл ПКО.

6.2.5. Установить все пробирки в блок детектирующего амплификатора;

6.2.6. Запустить программу амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 1.

Внимание! Для предотвращения контаминации при внесении в пробирки реагентов, образцов ДНК и контрольных образцов рекомендуется использовать только одноразовые наконечники с аэрозольными фильтрами.

Таблица 1 – Условия проведения амплификации и детекции результатов

Программа амплификации		
Температура	Время	Количество циклов
94°C	15 мин	1
94°C	20 сек	45
58°C	20 сек	
72°C	10 сек	
10°C – хранение		
Детекция флуоресцентного сигнала		
Специфический продукт	FAM	
Внутренний контроль	HEX	

6.3. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Детекция продуктов амплификации проводится в режиме реального времени с использованием детектирующего ПЦР-амплификатора согласно инструкции к прибору:

- по каналу FAM регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *Trichomonas vaginalis*;
- по каналу HEX регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента гена β-глобина человека (используется в качестве контроля взятия материала).

6.4. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.4.1. Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на соответствующем канале с пороговой

линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла C_t . Анализируемая проба считается положительной, если:

- график нарастания флуоресценции имеет форму экспоненциальной кривой;
- для пробы определено значение порогового цикла C_t ;
- кривая флуоресценции пересекает пороговую линию на участке экспоненциального роста.

6.4.2. Принцип интерпретации:

Учет результатов следует начинать с результатов амплификации положительного (ПКО) и отрицательного контрольных (ОКО) образцов.

6.4.2.1. Результаты анализа не учитываются, если:

- Во время прохождения реакции детектирующий амплификатор **не регистрирует** экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX в пробирке с ПКО; **в данной ситуации необходимо повторное исследование всех образцов;**
- Во время прохождения реакции детектирующий амплификатор **не регистрирует** экспоненциальный рост уровня флуоресценции по одному из каналов в пробирке с ПКО; **в данной ситуации необходимо повторное исследование всех образцов;**
- В пробирке с ОКО **регистрируется** экспоненциальный рост уровня флуоресценции по одному из каналов, либо по всем каналам флуоресценции. **Необходимо принятие мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов.**
- В пробирке с ПКО **регистрируется** экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX; в пробирке с ОКО **не регистрируется** рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX; в пробирке с анализируемым образцом **не регистрируется** рост уровня флуоресценции по каналу HEX; для такого образца процедура исследования должна быть проведена повторно, начиная со стадии выделения ДНК. При повторении результата делается вывод о плохом качестве взятия клинического материала, образец должен быть взят повторно.

6.4.2.2. Результаты анализа учитываются, если:

- Во время прохождения амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам FAM и HEX в пробирке с положительным контрольным образцом;

- Во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по каналам FAM и HEX в пробирке с отрицательным контрольным образцом;
- 6.4.2.3.** При соблюдении требований пункта 6.4.2.2. заключение о наличии либо отсутствии в анализируемом клиническом образце ДНК *Trichomonas vaginalis* делается в соответствии с Таблицей 2.

Таблица 2 – Интерпретация результатов исследования

	Наличие флуоресцентного сигнала	
	Канал FAM	Канал HEX
Образец положителен на наличие ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i>	+	+
Образец отрицателен на наличие ДНК <i>Trichomonas vaginalis</i>	-	+
Результат недостоверный	-	-
	+	-

7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА

- 7.1. Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.
- 7.2. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.
- 7.3. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.
- 7.4. Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.
- 7.5. Условия хранения отдельных компонентов набора «Трихомонас вагиналис» указаны на упаковке. Пробирки и стрипы со смесями для амплификации необходимо хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Раствор полимеразы, ПКО и ОКО необходимо хранить при температуре от 2 до 8 °С.
- 7.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 7.7. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

8. УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 8.1. Наборы, потерявшие свои потребительские качества в результате ненадлежащего хранения, а также наборы и их компоненты с истёкшим сроком годности подлежат утилизации в соответствии с СанПиН N2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», сбор отходов осуществляется в одноразовые пакеты желтого цвета, предназначенные для утилизации медицинских отходов класса Б (ГОСТ Р 50962-96).

8.2. Упаковка набора относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО «Альфалаб», 197022, Санкт Петербург, ул. Академика Павлова 14а, info@alphalabs.ru

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ИППП - инфекции, передаваемые половым путем

ПКО - положительный контрольный образец

ОКО - отрицательный контрольный образец

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ:



Номер серии



Только для in vitro диагностики



Дата изготовления



Срок годности



Хранить при температуре

Прошито и пронумеровано
В количестве 12 (двенадцать) листов

Генеральный директор ООО «Альфалаб»

Суворова М.А.