

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г № _____

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «ИПД ДНК-Технология»

Д.Ю.Трофимов

_____ 2008 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК

токсоплазмы гондии (*Toxoplasma gondii*)

методом полимеразной цепной реакции

(ТОКС-ГЕН)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ТОКС-ГЕН предназначен для выявления ДНК токсоплазмы гондии (*Toxoplasma gondii*) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биологическом материале человека (периферическая кровь, ликвор, биоптаты).

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Набор реагентов ТОКС-ГЕН основан на использовании амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации

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

В наборе ТОКС-ГЕН в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

В наборах в формате «Flash» и «Real-time» 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 специальными приборами.

ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомого фрагмента генома токсоплазмы гондии и внутреннего контрольного образца (ВК), мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации фрагмента генома токсоплазмы гондии и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

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

В зависимости от способа детекции результатов амплификации набор выпускается в трёх форматах:

формат «Flash» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора;

формат «Real-time» предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов;

формат «Форез» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Набор состоит из четырех комплектов:

а) комплект реагентов для выделения ДНК, включает:

- лизирующий раствор, 15 мл 1 флакон;
- сорбент, по 1,0 мл 2 пробирки;
- промывочный раствор №1, 40 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №2, 20 мл 1 флакон;
- промывочный раствор №3, 20 мл 1 флакон;
- элюирующий раствор, 10 мл 1 флакон.

Комплект является универсальным для всех форматов.

б) комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК токсоплазмы гондии:

вариант № 1 включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 100 пробирок;

- минеральное масло, по 1,0 мл 2 пробирки;
- раствор Taq-полимеразы, по 500 мкл 2 пробирки;
- ПЦР-буфер, 200 мкл 1 пробирка;
- положительный контрольный образец, 150 мкл 1 пробирка.

В состав смеси для амплификации входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, внутренний контрольный образец. В наборах форматов «Flash» и «Real-time» в состав смеси для амплификации входят флуоресцентные ДНК-зонды.

ПЦР-буфер включен только в комплекты для набора формата «Flash».

Комплект является специфичным для каждого формата («Flash», Real-time», «Форез»).

Вариант №2 включает:

- смесь для амплификации высушенную, 100 пробирок;
- растворитель, по 1,5 мл 2 пробирки;
- минеральное масло, по 1,0 мл 2 пробирки;
- положительный контрольный образец, по 150 мкл 1 пробирка.

г) комплект реагентов для детекции ДНК методом электрофореза включает:

- смесь для электрофореза - 1 пакет (16,9 г);
- агарозный гель - 5 пластин.

Комплект используется в наборе формата «Форез».

2.3 Время проведения анализа - 4 ч.

2.4 Набор рассчитан на проведение 100 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 токсоплазмы гондии, ПЦР-детектор (формат «Flash») или детектирующий амплификатор (формат «Real-time») должны регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза (формат «Форез»), должна быть видна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома токсоплазмы гондии размером 250 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК токсоплазмы гондии, ПЦР-детектор или детектирующий амплификатор должны регистрировать отрицательный результат. При использовании метода гель-электрофореза полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома токсоплазмы гондии 250 п.н. отсутствует, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 560 н.н., должна быть отчетливо видна.

3.2 ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА: 200 геном-эквивалентов ДНК токсоплазмы гондии на 1 мл образца.

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 26 (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.

4.8 При использовании набора формата «Форез» для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК, проведения ПЦР и электрофорез следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами и прочими принадлежностями.

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.

4.13 Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

4.14 При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1888-04.

При работе с набором реагентов ТОКС-ГЕН требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор (для форматов «Форез» и «Flash») или детектирующий амплификатор (для формата «Real-time»);
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;

- термостат твердотельный на 50 °С;
- микроцентрифуга/вортекс со скоростью вращения 1000-3000 об/мин;
- холодильник бытовой;
- пробирки одноразовые пластиковые объемом 1,5 мл;
- пипетки автоматические одноканальные с переменным объемом 0,5-10 мкл, 2,0-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток с маркировкой “RNAase-free, DNAase-free” объемом 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объемом 1-20 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;
- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

При работе с набором в формате «Flash» для детекции результатов требуется:

- ПЦР-детектор.

При детекции методом электрофореза (формат «Форез») требуются:

- источник постоянного тока;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор;
- колба мерная вместимостью 1,0 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1,0 мм.

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Ликвор, биоптаты забрать в стерильных условиях, перенести в пластиковые пробирки вместимостью 1500 мкл. Пробирки тщательно закрыть.

Взятие крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2-3 раза.

В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

Транспортировать и хранить образцы крови до начала исследования при температуре 2-8 °С в течение 6 ч, ликвор и биоптаты при температуре 2-8 °С в течение 24 ч.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

При выделении ДНК из ликвора и биоптатов выполнить пп.7.1.1-7.1.2, при выделении ДНК из периферической крови сразу перейти к п.3.

7.1.1 Центрифугировать пробирку, содержащую анализируемый материал, при 13000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

7.1.2 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.1.3 Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец «К-». Для этого в

отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл внести 50 мкл физиологического раствора стерильного.

7.1.4 В отдельной пластиковой пробирке смешать $150 \times (N+1)$ мкл лизирующего раствора №2 и $20 \times (N+1)$ предварительно ресуспендированного сорбента, где $N+1$ – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.

7.1.5 Добавить по 170 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.6 Термостатировать пробирки при температуре 50 °C в течение 20 мин.

7.1.7 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

7.1.8 Удалить надосадочную жидкость.

7.1.9. Добавить к осадку 400 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.10 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

7.1.11 Удалить надосадочную жидкость.

7.1.12 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.13 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

7.1.14 Удалить надосадочную жидкость.

7.1.15 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.16 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

7.1.17 Удалить надосадочную жидкость.

7.1.18 Открыть крышки пробирок и термостатировать пробирки при температуре 50 °C в течении 5 мин.

7.1.19 Добавить к осадку 100 мкл элюирующего раствора и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

7.1.20 Термостатировать пробирки при температуре 50 °C в течение 5 мин.

7.1.21 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре 2-8 °C. Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо повторить пп. 7.1.20 - 7.1.21.

Если препарат ДНК предполагается хранить более 7 суток, необходимо надосадочную жидкость (п.7.1.21) перенести в новую пробирку и хранить при температуре минус 20 °C в течение 6 месяцев.

Примечание: в лизирующем растворе и в промывочном растворе №1 допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 50 °C в течение 15-20 мин. Во избежание образования осадка допускается хранение лизирующего раствора и промывочного раствора №1 при температуре 18-25 °C.

Полученный препарат ДНК можно хранить при температуре 2-8 °С не более 7 суток, при температуре минус 20 °С не более 6 месяцев.

7.2 ПРОВЕДЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Пп. 7.2.1-7.2.3 выполняются в зоне приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР (МУ 1.3.1888-04).

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-». При использовании ПЦР-детектора для учета результатов амплификации (формат «Flash») промаркировать дополнительно две пробирки (ФОН) для контроля фона флуоресценции.

7.2.2 При использовании комплекта реагентов для ПЦР-амплификации варианта №1 во все промаркированные пробирки (кроме пробирок ФОН), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. В пробирки, промаркированные ФОН, добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.

При использовании комплекта реагентов для ПЦР-амплификации варианта №2 внести во все пробирки по 30 мкл растворителя.

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

7.2.4 Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенную для выделения ДНК из биологического материала.

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

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

7.2.6 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.

7.2.7 В пробирки, промаркированные ФОН, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (см.п.7.1).

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

7.2.9 Установить все пробирки, за исключением пробирок из варианта №2, маркированных «ФОН», в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном для амплификаторов с активным регулированием, с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл (табл.1-4). При использовании комплекта реагентов для ПЦР-амплификации варианта №2 пробирки, маркированные «ФОН», поместить в холодильник при температуре 2-8°C.

Таблица 1. Формат «Flash». Режим амплификации для амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»). Алгоритм регулирования: «точный».

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1	94°C	1 мин	1
2	94°C 64°C 67°C	5 с 5 с 5 с	5
3	94°C 64°C 67°C	1 с 5 с 5 с	40
4	10°C	Хранение	

Таблица 2. Формат «Real-time»
Режим амплификации для детектирующих амплификаторов
ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °C 94 °C	1 мин 1 мин 30 с	1
2.	94 °C 64 °C*	30 с 15 с	5
3.	94 °C 64 °C*	10 15	45
4.	10 °C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 3. Формат «Real-time»
Режим амплификации для амплификатора
iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Режим для dynamicwf.tmo			
№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °C 94 °C	1 мин 1 мин 30 с	1
2.	94 °C 64 °C	30 с 45 с	5
3.	80 °C*	30 с	2
Режим амплификации			
1.	94 °C 64 °C*	10 с 45 с	45
2.	10 °C	Хранение	

*- регистрация результатов

Таблица 4. Формат «Форез». Режим амплификации для амплификатора
«Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»). Алгоритм регулирования: «точный».

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	94 °C	1 мин 30 с	1
2.	94 °C 64 °C 72 °C	20 с 5 с 5 с	5
3.	94 °C 64 °C 72 °C	5 с 5 с 5 с	40
4.	10 °C	Хранение	

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

Примечание: При работе с наборами в формате «Flash» готовые нормировочные пробирки (ФОН) допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК. Нормировочные пробирки хранить при 2-8 °С в течение 1 месяца в темном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18-25 °С), для чего за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-ДЕТЕКТОРА

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

8.2 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩИХ АМПЛИФИКАТОРОВ ДТ-322, ДТ-96

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-322, ДТ-96). ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации фрагмента токсоплазмы гондии и

внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно.

8.3 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА ICYCLER IQ (BIO-RAD LABORATORIES)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ). ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации фрагмента генома токсоплазмы гондии и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно.

8.4 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

8.4.1 Открыть крышки пробирок с продуктами амплификации и проколоть в парафине отверстие диаметром примерно 2-3 мм с помощью стальной проволоки. После прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в емкости с водопроводной водой.

8.4.2 Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу объемом 1 л, добавить приблизительно 700 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения и довести дистиллированной водой до метки.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18-25 °C) в течение 1 недели или при температуре 2-8 °C в течение 1 мес.

8.4.3 Заполнить камеру для электрофореза буферным раствором для электрофореза и поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 3-5 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

8.4.4 Осторожно внести 7,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буферный раствор.

8.4.5 Установить крышку камеры для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 вольт/см в течение 10 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

8.4.6 После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.

8.4.7 Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.

8.4.8 Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты. Продукт

амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

9 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-ДЕТЕКТОРА ИЛИ ДЕТЕКТИРУЮЩЕГО АМПЛИФИКАТОРА

9.1.1 Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

9.1.2 В биологических образцах, содержащих ДНК токсоплазмы гондии (специфический продукт):

- программа ПЦР-детектора фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается;

- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта.

9.1.3 В биологических образцах, не содержащих ДНК токсоплазмы гондии:

- программа ПЦР-детектора при положительном результате амплификации внутреннего контрольного образца фиксирует отрицательный результат;

- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции внутреннего контрольного образца и отсутствие экспоненциального роста кривой для специфического продукта.

9.1.4 Результат оценивается как недостоверный в случае:

- отрицательного результата на наличие ДНК токсоплазмы гондии и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца (ПЦР-детектор);
- отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта и для внутреннего контрольного образца (детектирующий амплификатор).

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 либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.1.5 Программа ПЦР-детектора фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфического продукта попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.1.6 При получении положительного результата (ПЦР-детектор) или экспоненциального роста флуоресценции (детектирующий амплификатор) для специфического продукта в отрицательном контрольном образце «К-» результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

9.2 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

9.2.1 В положительных образцах должны быть видны полосы оранжево-красного цвета на уровне полосы положительного контрольного образца, соответствующие фрагменту генома токсоплазмы гондии размером 250 п.н. Наличие или отсутствие полосы, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., в этом случае в учет не принимают.

9.2.2 В отрицательных образцах, в том числе в отрицательном контрольном образце, светящиеся полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту генома токсоплазмы гондии размером 250 п.н. должны отсутствовать, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., должна быть отчетливо видна.

9.2.3 В случае отсутствия в исследуемом образце полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту токсоплазмы гондии размером 250 п.н. и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 560 п.н., результат считают недостоверным.

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

9.2.4 В случае наличия полосы, соответствующей фрагменту генома специфичного продукта, в отрицательном контрольном образце «К-» результаты всей постановочной серии считают недостоверными. 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 Комплекты реагентов для выделения ДНК из биологического материала, ПЦР-амплификации и детекции ДНК методом электрофореза 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 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- лизирующий раствор №2 и промывочный раствор №1 следует хранить в темном месте; допускается хранение лизирующего раствора и промывочного раствора №1 при температуре 18-25 °С.
- буферный раствор для электрофореза хранить при температуре 18-25 °С не более 7 дней или при температуре 2-8 °С не более 1 мес.

10.5 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

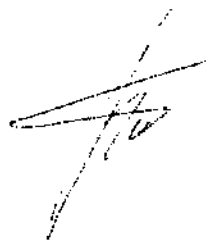
Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора ТОКС-ГЕН, следует обращаться в ЗАО «НПФ ДНК-Технология» по адресу:

115478, Москва, Каширское ш., д. 23-5, офис 16

телефон/факс (495) 980-45-55

Ведущий научный сотрудник
ЗАО «НПФ ДНК-Технология»,
кандидат биологических наук



Е.В.Гончарова

«5» июля 2008г

«СОГЛАСОВАНО»

Ведущий научный сотрудник
ГНЦ «Институт иммунологии
ФМБА России»



Т.И. Федосеева

«5» августа 2008г