

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК возбудителей инфекций, передающихся половым путём (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, вирусов папилломы человека 16 и 18 типов), методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ПЦР-12 ИППП»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ПЦР-12 ИППП» предназначен для выявления ДНК возбудителей инфекций, передающихся половым путём (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ1,2), вирусов папилломы человека 16 и 18 типов (ВПЧ 16/18), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 3» и «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы. Для анализа каждого образца необходимо 6 пробирок одного стрипа.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичных для данных участков ДНК возбудителей инфекций, передающихся половым путём, гибридизационных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5' конце флуоресцентный краситель, а на 3' конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3' нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5' конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции.

При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в образце ПКО, который подвергается процедуре выделения ДНК вместе с анализируемыми биопробами.

Учет эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителей инфекций, передающихся половым путём, из клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизованная – 96 стрипов по 6 пробирок (каждый стрип содержит все исследуемые маркёры).

Набор дополнительно комплектуется оптической плёнкой или стрипированными крышками.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий ДНК каждой из 12 инфекций, передающихся половым путём (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, цитомегаловируса (ЦМВ); вируса простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1, 2); вирусов папилломы человека 16 и 18 типов (ВПЧ 16/18) в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК каждой из 12 инфекций, передающихся половым путём (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1, 2), вирусов папилломы человека 16 и 18 типов (ВПЧ 16/18) по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»;

0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8°C;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитроновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром / аэрозольным барьером/ (фирма Biohit, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный);
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Подготовить образцы для исследования с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100» в соответствии с инструкцией по применению набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать положительный контрольный образец универсальный (ПКО), который является компонентом данного набора, и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать не менее 30 минут при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов.

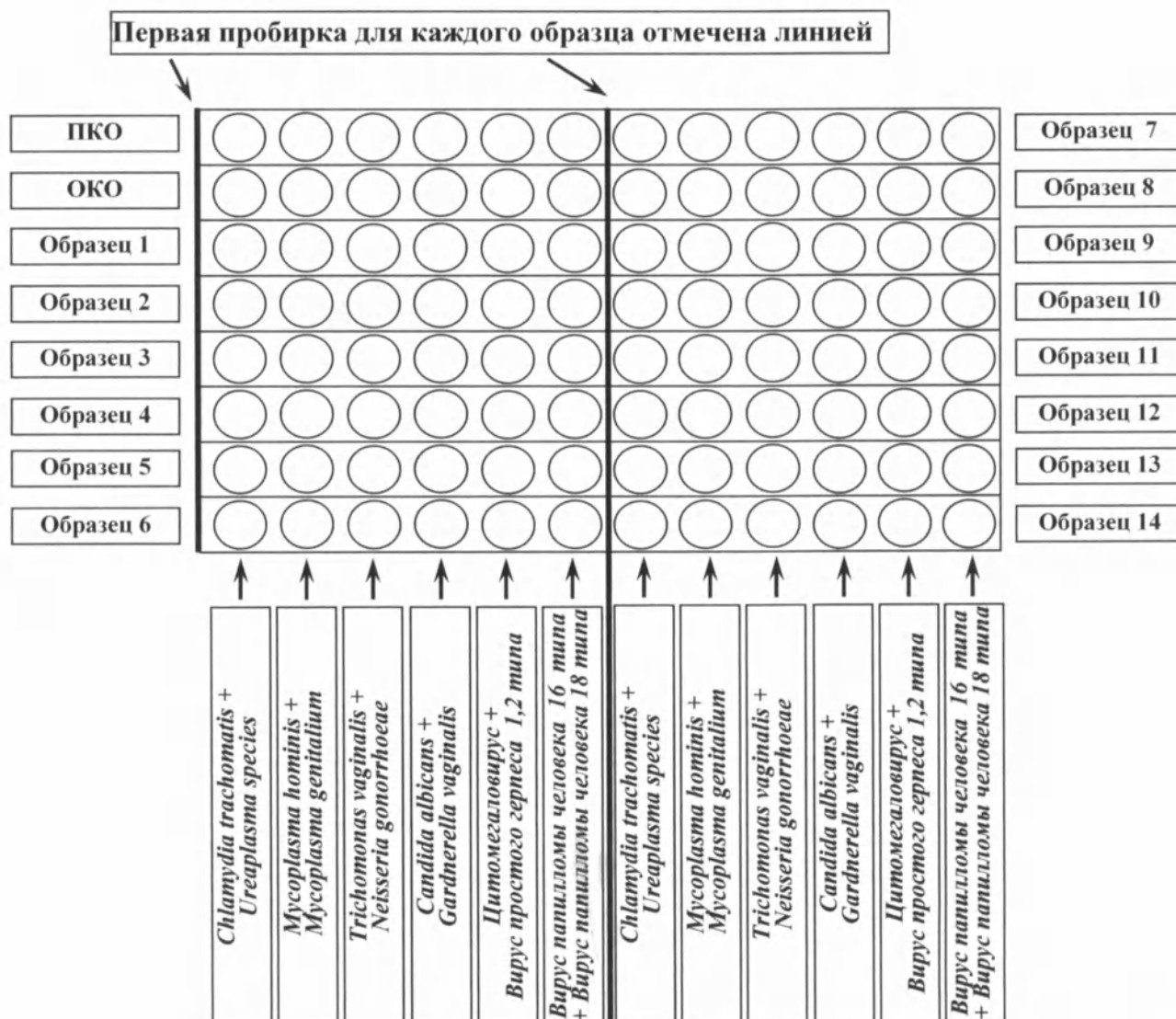
Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать готовую реакционную смесь для ПЦР (ГРС) в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отрезать канцелярским ножом необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) стрипов с ГРС (по 6 пробирок). Отрезать стрипы следует вместе с покрывающей их плёнкой. Оставшиеся неиспользованными стрипы с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

Выделенную ДНК хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия пробирки хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 месяца.

Для выявления ДНК 12 инфекций, передающихся половым путём, для каждого образца используется 6 пробирок (см. рисунок 1).

Рисунок 1



7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) стрипов с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Крышки или оптическая плёнка должны оставаться чистыми!

7.3. В каждую из 6 пробирок стрипа (см. рисунок 1) пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Плотнo закрыть пробирки крышками или заклеить оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и ВКО, и детекции сигналов флуоресценции.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

3 стадия: 94 °C – 1 мин;

4 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 20 сек).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК возбудителей инфекций и ВКО:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM».

Для регистрации процесса амплификации ДНК возбудителей инфекций следует выбрать канал детекции «HEX» и «ROX» (см. таблицу 1).

Таблица 1

Номер пробирки в стрипе	Инфекция	Канал
1	<i>Chlamydia trachomatis</i>	HEX
	<i>Ureaplasma species</i>	ROX
2	<i>Mycoplasma hominis</i>	HEX
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	ROX
3	<i>Trichomonas vaginalis</i>	ROX
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	HEX
4	<i>Candida albicans</i>	ROX
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	HEX
5	Цитомегаловирус	ROX
	Вирус простого герпеса 1, 2 типа	HEX
6	Вирус папилломы человека 16 типа	HEX
	Вирус папилломы человека 18 типа	ROX

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролем согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой «РеалБест диагностика» программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов или при отсутствии программы «РеалБест Диагностика» учет результатов проводить в соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК возбудителей инфекций по каналу «HEX» и по каналу «ROX» (см. таблицу 1) и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО.

9.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «HEX» и «ROX».

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

9.4. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим ДНК соответствующего возбудителя инфекции (кроме *Gardnerella vaginalis*), если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» или по каналу «ROX» (см. таблицу 1) меньше или равно 40.

Образец считается содержащим ДНК *Gardnerella vaginalis*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» в 4 пробирке стрипа меньше или равно 32.

9.6. Результат анализа образца считается отрицательным, т.е. не содержащим ДНК соответствующего возбудителя инфекции (кроме *Gardnerella vaginalis*), если для этого образца

значение C_t по каналу «HEX» или по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Образец считается не содержащим ДНК *Gardnerella vaginalis*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» в 4 пробирке стрипа больше 32.

Если для такого образца значение C_t ВКО отличается от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

9.7. Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» или «HEX» меньше или равно 40 (по каналу «HEX» в 4 пробирке стрипа меньше или равно 32), то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора «РеалБест ПЦР-12 ИППП» должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест ПЦР-12 ИППП» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ПЦР-12 ИППП», следует обращаться в **ЗАО «Вектор-Бест»** по адресу:

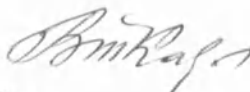
630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru.

Начальник отделения
ЗАО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе
ГУЗМ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского
профессор, д.м.н.



 М.М. Абакумов

Протипувано, протипувано
и скреплено печатю
9 листов

С.А.



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор



«Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК возбудителей инфекций, передающихся половым путём

(*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, вирусов папилломы человека 16 и 18 типов), методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ПЦР-12 ИППП»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ПЦР-12 ИППП» предназначен для выявления ДНК возбудителей инфекций, передающихся половым путём (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ1,2), вирусов папилломы человека 16 и 18 типов (ВПЧ 16/18), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 3» и «РеалБест экстракция 100».

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы. Для анализа каждого образца необходимо 6 пробирок одного стрипа.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичных для данных участков ДНК возбудителей инфекций, передающихся половым путём, гибридизационных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5' конце флуоресцентный краситель, а на 3' конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3' нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5' конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции.

При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Достоверность анализа контролируется по наличию положительного результата в образце ПКО, который подвергается процедуре выделения ДНК вместе с анализируемыми биопробами.

Учет эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителей инфекций, передающихся половым путём, из клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 стрипов по 6 пробирок (каждый стрип содержит все исследуемые маркёры).

Набор дополнительно комплектуется оптической плёнкой или стрипированными крышками.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий ДНК каждой из 12 инфекций, передающихся половым путём (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, цитомегаловируса (ЦМВ); вируса простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1, 2); вирусов папилломы человека 16 и 18 типов (ВПЧ 16/18) в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК каждой из 12 инфекций, передающихся половым путём (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma species*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1, 2), вирусов папилломы человека 16 и 18 типов (ВПЧ 16/18) по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК/РНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, исследующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»;

0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:
«iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8°C;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитроновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром / аэрозольным барьером/ (фирма Biohit, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 – 2 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный);
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Подготовить образцы для исследования с помощью наборов для выделения ДНК «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 100» в соответствии с инструкцией по применению набора.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать положительный контрольный образец универсальный (ПКО), который является компонентом данного набора, и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать не менее 30 минут при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов.

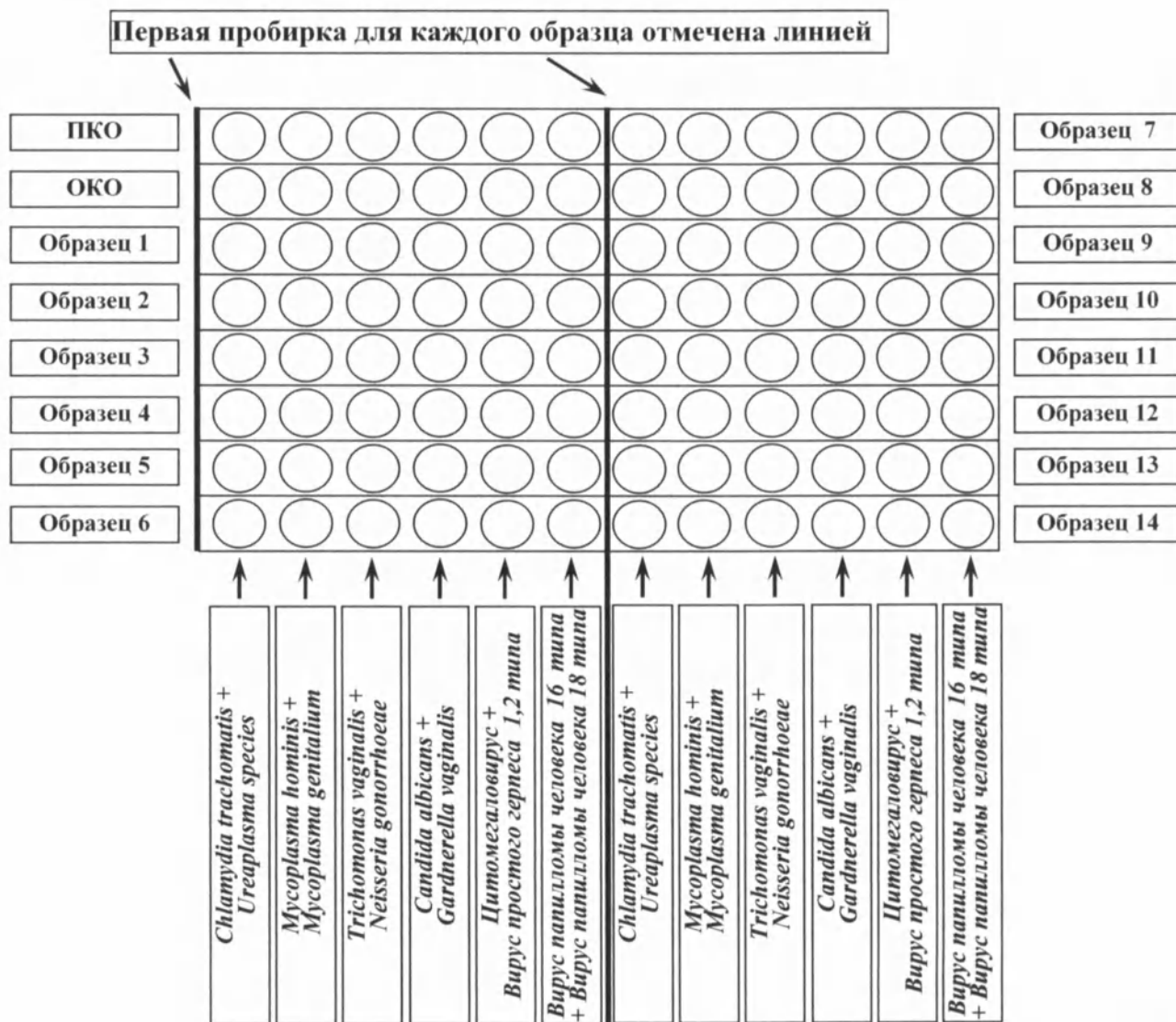
Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать готовую реакционную смесь для ПЦР (ГРС) в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку и отрезать канцелярским ножом необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) стрипов с ГРС (по 6 пробирок). Отрезать стрипы следует вместе с покрывающей их плёнкой. Оставшиеся неиспользованными стрипы с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

Выделенную ДНК хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия пробирки хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 месяца.

Для выявления ДНК 12 инфекций, передающихся половым путём, для каждого образца используется 6 пробирок (см. рисунок 1).

Рисунок 1



7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) стрипов с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Крышки или оптическая плёнка должны оставаться чистыми!

7.3. В каждую из 6 пробирок стрипа (см. рисунок 1) пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Плотно закрыть пробирки крышками или заклеить оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и ВКО, и детекции сигналов флуоресценции.

Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

3 стадия: 94 °C – 1 мин;

4 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 20 сек).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК возбудителей инфекций и ВКО:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM».

Для регистрации процесса амплификации ДНК возбудителей инфекций следует выбрать канал детекции «HEX» и «ROX» (см. таблицу 1).

Таблица 1

Номер пробирки в стрипе	Инфекция	Канал
1	<i>Chlamydia trachomatis</i>	HEX
	<i>Ureaplasma species</i>	ROX
2	<i>Mycoplasma hominis</i>	HEX
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	ROX
3	<i>Trichomonas vaginalis</i>	ROX
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	HEX
4	<i>Candida albicans</i>	ROX
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	HEX
5	Цитомегаловирус	ROX
	Вирус простого герпеса 1, 2 типа	HEX
6	Вирус папилломы человека 16 типа	HEX
	Вирус папилломы человека 18 типа	ROX

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.9. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой «РеалБест диагностика» программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов или при отсутствии программы «РеалБест Диагностика» учет результатов проводить в соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК возбудителей инфекций по каналу «HEX» и по каналу «ROX» (см. таблицу 1) и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО.

9.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «HEX» и «ROX».

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

9.4. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим ДНК соответствующего возбудителя инфекции (кроме *Gardnerella vaginalis*), если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» или по каналу «ROX» (см. таблицу 1) меньше или равно 40.

Образец считается содержащим ДНК *Gardnerella vaginalis*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» в 4 пробирке стрипа меньше или равно 32.

9.6. Результат анализа образца считается отрицательным, т.е. не содержащим ДНК соответствующего возбудителя инфекции (кроме *Gardnerella vaginalis*), если для этого образца

значение C_t по каналу «HEX» или по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Образец считается не содержащим ДНК *Gardnerella vaginalis*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» в 4 пробирке стрипа больше 32.

Если для такого образца значение C_t ВКО отличается от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

9.7. Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» или «HEX» меньше или равно 40 (по каналу «HEX» в 4 пробирке стрипа меньше или равно 32), то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора «РеалБест ПЦР-12 ИППП» должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест ПЦР-12 ИППП» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru.

 А.В. Трухина

В.К.Т. В.К. Ткачев

д.м.н., профессор В.В. Долгов

Подпись В.М. Дроздов
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАО
Подпись _____
" ____ " _____ 20 ____ года

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
9 листов

