

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от __ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для определения ДНК цитомегаловируса методом
полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ЦМВ»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ЦМВ» предназначен для определения ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как планшетного («iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)), так и роторного («Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия)) типа или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест ДНК ЦМВ» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала (соскобы из цервикального канала, уретры, слюна, моча, ликвор).

Выделение ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) из клинического материала проводится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100».

Набор рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг

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

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 специфичного для данного участка ДНК ЦМВ гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается 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 бактериальной ДНК 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 ЦМВ из клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- Положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагментов ДНК возбудителей инфекций – 1 флакон (1 мл);
- Реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок;
- Раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона (по 2 мл);

Внимание! ПКО должен пройти процедуру выделения ДНК с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции к соответствующему набору.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность - определение 100 копий ДНК ЦМВ в пробе - 100 %.

3.2. Специфичность определения ДНК ЦМВ (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов) - 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (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. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-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 реальном времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000/6000» (фирма Corbet Research, Австралия);

или

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом (фирма «Ламинарные системы», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (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);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма Ахуген, США);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью набора для выделения ДНК «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100» в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

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

Выделенную ДНК хранить в течение 2 суток при температуре от 2 до 8 °С.

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 °С.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить в течение 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

7.1.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с реакционной смесью для ПЦР (РС).

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС сразу упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.1.2. В пробирку с реакционной смесью для ПЦР (РС) добавить 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при температуре от 18 до 25 °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

После восстановления хранить реакционную смесь при температуре от 2 до 8 °С не более 2 недель.

Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить в течение 1 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.1.3. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 0,2 мл (по числу подготовленных проб, включая контроли). Необходимо учитывать, что каждая постановка ПЦР должна содержать 1 ОКО и 1 ПКО.

7.2. В каждую пробирку внести 25 мкл реакционной смеси для ПЦР (РС).

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Плотнo закрыть пробирки крышками.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК ЦМВ и ВКО и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции ПЦР.

Для приборов «Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия

1 стадия: 94°С – 1 мин;

2 стадия: 50 циклов (94°С – 10 с, 60°С – 40 с).

Для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия):

1 стадия: 94°С – 1 мин;

2 стадия: 50 циклов (94°С – 10 с, 60°С – 20 с).

Измерение флуоресценции проводить при 60°С.

7.7. Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента ДНК ВКО в системе применен гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM».

Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента ДНК ЦМВ в системе применен гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором ROX. Для детекции следует выбирать канал детекции «ROX».

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

7.9. Запустить программу и провести ПЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

При использовании других амплификаторов учет результатов выполняется проводить в соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В положительном контрольном образце программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ЦМВ (канал «ROX») 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 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации фрагмента ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом не должно быть нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК ЦМВ.

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации фрагмента 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 учитывается как отрицательный (не содержащий ДНК ЦМВ), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ 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.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим ДНК ЦМВ, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.7. Если для ПКО значение C_t ЦМВ больше 40 или не определяется, то все отрицательные результаты считаются недостоверными и требуют перестановки.

9.8. Если для ОКО значение C_t ЦМВ меньше или равно 40, то это свидетельствует о на-

Д. Сергеев 2.4.1

Шушунбаев
Исмаилов
И. Сергеев



УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от __ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для определения ДНК цитомегаловируса методом

полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ЦМВ»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ЦМВ» предназначен для определения ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как планшетного («iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)), так и роторного («Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия)) типа или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест ДНК ЦМВ» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала (соскобы из цервикального канала, уретры, слюна, моча, ликвор).

Выделение ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) из клинического материала проводится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100».

Набор рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг

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

праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Таq ДНК-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК ЦМВ гибридизационного ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается 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 Таq 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 бактериальной ДНК 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 ЦМВ из клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- Положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагментов ДНК возбудителей инфекций – 1 флакон (1 мл);
- Реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок;
- Раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона (по 2 мл);

Внимание! ПКО должен пройти процедуру выделения ДНК с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции к соответствующему набору.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность - определение 100 копий ДНК ЦМВ в пробе - 100 %.

3.2. Специфичность определения ДНК ЦМВ (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов) - 100 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-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 реальном времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000/6000» (фирма Corbet Research, Австралия);

или

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в реальном времени планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ламинарный бокс II-го класса биологической защиты, предназначенный для работы с инфекционным материалом (фирма «Ламинарные системы», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (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);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма Axugen, США);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью набора для выделения ДНК «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1» или «РеалБест экстракция 100» в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

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

Выделенную ДНК хранить в течение 2 суток при температуре от 2 до 8 °С.

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 °С.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить в течение 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

7.1.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с реакционной смесью для ПЦР (РС).

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС сразу упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.1.2. В пробирку с реакционной смесью для ПЦР (РС) добавить 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 минут при температуре от 18 до 25 °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

После восстановления хранить реакционную смесь при температуре от 2 до 8 °С не более 2 недель.

Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить в течение 1 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.1.3. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 0,2 мл (по числу подготовленных проб, включая контроли). Необходимо учитывать, что каждая постановка ПЦР должна содержать 1 ОКО и 1 ПКО.

7.2. В каждую пробирку внести 25 мкл реакционной смеси для ПЦР (РС).

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Плотнo закрыть пробирки крышками.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК ЦМВ и ВКО и детекции флуоресцентных сигналов. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции ПЦР.

Для приборов «Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия

1 стадия: 94°С – 1 мин;

2 стадия: 50 циклов (94°С – 10 с, 60°С – 40 с).

Для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия):

1 стадия: 94°С – 1 мин;

2 стадия: 50 циклов (94°С – 10 с, 60°С – 20 с).

Измерение флуоресценции проводить при 60°С.

7.7. Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента ДНК ВКО в системе применен гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM».

Для детектирования сигнала при амплификации фрагмента ДНК ЦМВ в системе применен гибридизационный ДНК-зонд, меченный флуорофором ROX. Для детекции следует выбирать канал детекции «ROX».

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

7.9. Запустить программу и провести ПЦР с флуоресцентной регистрацией в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

При использовании других амплификаторов учет результатов выполняется проводить в соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В положительном контрольном образце программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ЦМВ (канал «ROX») 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 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации фрагмента ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом не должно быть нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК ЦМВ.

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации фрагмента 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 учитывается как отрицательный (не содержащий ДНК ЦМВ), если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ 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.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, т.е. содержащим ДНК ЦМВ, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

9.7. Если для ПКО значение C_t ЦМВ больше 40 или не определяется, то все отрицательные результаты считаются недостоверными и требуют перестановки.

9.8. Если для ОКО значение C_t ЦМВ меньше или равно 40, то это свидетельствует о на-

личии контаминации в системе. В случае контаминации все положительные результаты по 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 данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание наборов 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 наборов 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 требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

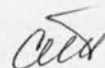
Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, 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.

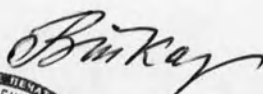
Начальник отделения

ЗАО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Директор ГУЗ НИИ СП
им. Н.В. Склифосовского



 М.Ш. Хубутия



Проинформировать
проинформировать
среднею школу
4 (семь) мест

И. /Перфильева Е.А. /