

УТВЕРЖДЕНА

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2010 г. № _____



Генеральный директор
«Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

22 марта 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для дифференциального выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum*
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum*
(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum*» предназначен для дифференциального выявления ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum*, выделенной из клинических проб, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

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

Комплект 1 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.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 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 праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

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

В основе используемого метода регистрации лежит измерение флуоресценции в каждом цикле ПЦР.

Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК возбудителя инфекции гибрида ДНК-зонда, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая 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'экзонуклеазной активности Taq-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.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum* из клинических проб совместно с предварительно внесённым неконкурентным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагментов ДНК *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum* – 1 флакон (1,0 мл);
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок).

Набор дополнительно комплектуется:

- стрипированными крышками для пробирок (12 стрипов по 8 штук) или оптической плёнкой – 3 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – определение 100 копий ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность определения ДНК *Ureaplasma urealyticum* и ДНК *Ureaplasma parvum* (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 1 (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 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 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 °С;

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

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; 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 FinnTip, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 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).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест ДНК экстракция 100» согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

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.

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.

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с готовой реакционной смесью. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в целфеновый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

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

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с готовой реакционной смесью для ПЦР (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 пробирку 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 *Ureaplasma urealyticum*, ДНК *Ureaplasma parvum* и ВКО, и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 94 °C – 1 мин;

2 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 *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* и ВКО:

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

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Ureaplasma urealyticum* следует выбрать канал детекции «HEX».

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Ureaplasma parvum* следует выбрать канал детекции «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 учет результатов проводить в соответ-

вии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Ureaplasma urealyticum* типа (канал «HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Ureaplasma parvum* (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 (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 *Ureaplasma urealyticum*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» меньше или равно 40.

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

9.7. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t по каналам «HEX» и «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.

9.8. Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» или «HEX» меньше или равно 40, 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 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 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.

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



Проинформировано,
проинспектировано
сметными работами
№ (смет) листов
Д