

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

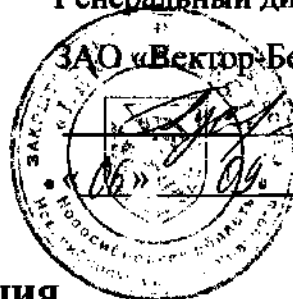
«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium*

методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*» предназначен для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium*, выделенной из клинических проб, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-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».

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.

А

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 гибридационного 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 *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* из образцов обеспечивается выделением ДНК 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 *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium* – 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 – выявление 100 копий ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* (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 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

17

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;

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; 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 FinnTir, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 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

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 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 не более 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 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 целфленовый 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 *Chlamydia trachomatis*, ДНК *Mycoplasma genitalium* 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 канал детекции результатов амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и ВКО:

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

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* следует выбрать канал детекции «HEX».

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* 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-

вин с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* (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, содержащим ДНК *Chlamydia trachomatis*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» меньше или равно 40.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma genitalium*, 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

d

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.

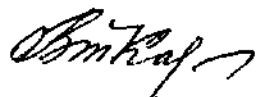
Начальник отделения

ЗАО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе Московского

Областного Научно-исследовательского

Клинического института М.Ф. Владимирского

(МОНИКИ)



 В.И. Шумский



Процедуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
22.11.16 листов

1 (Переводов Е.А.)

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium*

методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*» предназначен для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium*, выделенной из клинических проб, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-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».

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

Комплект 2 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 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.

1

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 гибридизационного 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 Таq-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 *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* из образцов обеспечивается выделением ДНК 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 *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium* – 1 флакон (1,0 мл);

- реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок, каждая на 10 определений;

- раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона (по 2,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* (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 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 и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 1888-04 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV группы 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 роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия) или планшетного типа: «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 FinnTir, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма Ахугеп, США) или аналогичные;
- 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 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 не более 2 суток.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

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

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС 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.

В пробирку с реакционной смесью для ПЦР (РС) добавить 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин 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 °C не более 2 недель.

Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 3 месяцев.

7.2. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ПЦР должна содержать 1 ОКО и 1 ПКО.

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.3. Во все пробирки пипеткой с наконечником с фильтром внести по 25 мкл реакционной смеси для ПЦР (РС).

7.4. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. Плотно закрыть пробирки крышками.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации ДНК специфических фрагментов *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и ВКО, и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

– для приборов «Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000»:

1 стадия: 94 °C – 1 мин;

2 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 40 сек);

– для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 94 °C – 1 мин;

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

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и ВКО:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM» (для приборов «Rotor-Gene 3000», «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»), «Green» (для прибора «Rotor-Gene 6000»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* следует выбрать канал детекции «JOE/Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 3000/6000»), «HEX» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* следует выбрать канал детекции «ROX» (для приборов «Rotor-Gene 3000», «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»), «Orange» (для прибора «Rotor-Gene 6000»).

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

7.10. 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 соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* типа (канал «JOE»/«Yellow»/«HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/«Green») 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 «JOE»/«Yellow»/«HEX» и «ROX»/«Orange».

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

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

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Chlamydia trachomatis*, если для этого образца значение C_t по каналу «JOE»/ «Yellow» /«HEX») меньше или равно 40.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma genitalium*, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX»/ «Orange» меньше или равно 40.

9.7. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t по каналам «JOE»/ «Yellow» /«HEX») и «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение $Ct\ BKO$ превышает значение $(Ct\ BKO)_{cp}$ 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 каналам «JOE»/ «Yellow» /«HEX»), «ROX»/ «Orange» 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 техниче-

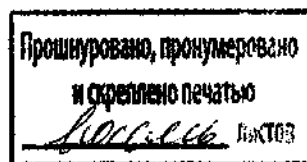
Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

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

~~True~~

Bm Key

8



А (Директор Е.А.)

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор



М.Д. Хусаинов

29 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium*

методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*» предназначен для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium*, выделенной из клинических проб, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-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».

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.

11

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 *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* из образцов обеспечивается выделением ДНК 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 *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium* – 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 – выявление 100 копий ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* (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 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 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;

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; 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 FinnTip, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 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

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 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 не более 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 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. Плотно закрыть пробирки крышками или заклеить оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis*, ДНК *Mycoplasma genitalium* 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 канал детекции результатов амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и ВКО:

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

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* следует выбрать канал детекции «HEX».

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* 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 *Chlamydia trachomatis* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* (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, содержащим ДНК *Chlamydia trachomatis*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» меньше или равно 40.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma genitalium*, 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



Применовано, пронумеровано
и скреплено печатью
4-116 листов

(Терришвили В.А.)

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

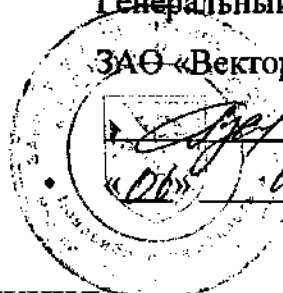
«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium*

методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*» предназначен для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium*, выделенной из клинических проб, 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».

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

Комплект 2 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 праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Таq-полимеразой.

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

11

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 гибридационного 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 *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* из образцов обеспечивается выделением ДНК 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 *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium* – 1 флакон (1,0 мл);

- реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок, каждая на 10 определений;

- раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона (по 2,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* (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 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 роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия) или планшетного типа: «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);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма Ахугеп, США) или аналогичные;
- 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 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 не более 2 суток.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

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

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС 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.

В пробирку с реакционной смесью для ПЦР (РС) добавить 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин 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 °C не более 2 недель.

Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 3 месяцев.

7.2. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ПЦР должна содержать 1 ОКО и 1 ПКО.

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.3. Во все пробирки пипеткой с наконечником с фильтром внести по 25 мкл реакционной смеси для ПЦР (РС).

7.4. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. Плотнo закрыть пробирки крышками.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации ДНК специфических фрагментов *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и ВКО, и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

– для приборов «Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000»:

1 стадия: 94 °C – 1 мин;

2 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 40 сек);

– для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 94 °C – 1 мин;

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

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и ВКО:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM» (для приборов «Rotor-Gene 3000», «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»), «Green» (для прибора «Rotor-Gene 6000»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* следует выбрать канал детекции «JOE/Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 3000/6000»), «HEX» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* следует выбрать канал детекции «ROX» (для приборов «Rotor-Gene 3000», «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»), «Orange» (для прибора «Rotor-Gene 6000»).

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

7.10. 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 соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* типа (канал «JOE»/ «Yellow» /«HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* (канал «ROX»/ «Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/ «Green») 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 «JOE»/ «Yellow» /«HEX» и «ROX»/ «Orange».

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

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

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Chlamydia trachomatis*, если для этого образца значение C_t по каналу «JOE»/ «Yellow»/«HEX») меньше или равно 40.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma genitalium*, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX»/ «Orange» меньше или равно 40.

9.7. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t по каналам «JOE»/ «Yellow»/«HEX») и «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение $Ct\ ВКО$ превышает значение $(Ct\ ВКО)_{ср}$ 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 каналам «JOE»/ «Yellow»/«HEX»), «ROX»/ «Orange» 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 техниче-

ских 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

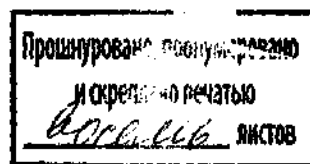
ГУЗМ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

профессор, д.м.н.





М.М. Абакумов



А (Турчинова В.А.)

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium*

методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*» предназначен для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium*, выделенной из клинических проб, 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».

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.

01

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 гибридационного 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 *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* из образцов обеспечивается выделением ДНК 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 *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium* – 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 – выявление 100 копий ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* (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 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;

– 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 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

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 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 не более 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 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 целфленовый 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. Плотно закрыть пробирки крышками или заклеить оптической плёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК *Chlamydia trachomatis*, ДНК *Mycoplasma genitalium* 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 канал детекции результатов амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и ВКО:

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

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* следует выбрать канал детекции «HEX».

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* 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 *Chlamydia trachomatis* (канал «HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* (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, содержащим ДНК *Chlamydia trachomatis*, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» меньше или равно 40.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma genitalium*, 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.

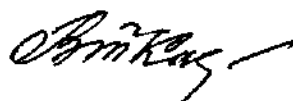
Начальник отделения

ЗАО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»

Подпись: 
Удостоверен специалист по
качеству работы ГОУ ДПО



Д.м.н., профессор Долгов В.В.

20__ г.



Проинформировано, проинформировано
и скреплено печатью
С.С.С.С. АИСТОС

А (Сергеева Е.А.)

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2010 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium*

методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*» предназначен для выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium*, выделенной из клинических проб, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-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».

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

Комплект 2 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 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 гибридизационного 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 *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* из образцов обеспечивается выделением ДНК 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 *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium* – 1 флакон (1,0 мл);
- реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок, каждая на 10 определений;
- раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона (по 2,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* и ДНК *Mycoplasma genitalium* (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 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 роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия) или планшетного типа: «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, «ЦиклюТемп» 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 неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);

- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTir, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма Ахуген, США) или аналогичные;
- 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 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 не более 2 суток.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

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

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС 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.

В пробирку с реакционной смесью для ПЦР (РС) добавить 300 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при температуре от 18 до 25 °С,

Л

после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

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

Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 3 месяцев.

7.2. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ПЦР должна содержать 1 ОКО и 1 ПКО.

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.3. Во все пробирки пипеткой с наконечником с фильтром внести по 25 мкл реакционной смеси для ПЦР (РС).

7.4. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. Плотно закрыть пробирки крышками.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации ДНК специфических фрагментов *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и ВКО, и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

– для приборов «Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000»:

1 стадия: 94 °C – 1 мин;

2 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 40 сек);

– для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 94 °C – 1 мин;

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

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и ВКО:

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВКО следует выбрать канал детекции «FAM» (для приборов «Rotor-Gene 3000», «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»), «Green» (для прибора «Rotor-Gene 6000»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* следует выбрать канал детекции «JOE/Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 3000/6000»), «HEX» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* следует выбрать канал детекции «ROX» (для приборов «Rotor-Gene 3000», «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»), «Orange» (для прибора «Rotor-Gene 6000»).

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

7.10. 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 соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

- нарастание сигнала амплификации ДНК *Chlamydia trachomatis* типа (канал «JOE»/ «Yellow» /«HEX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК *Mycoplasma genitalium* (канал «ROX»/ «Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»/ «Green») 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 «JOE»/ «Yellow» /«HEX» и «ROX»/ «Orange».

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

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

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Chlamydia trachomatis*, если для этого образца значение C_t по каналу «JOE»/ «Yellow» /«HEX») меньше или равно 40.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК *Mycoplasma genitalium*, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX»/ «Orange» меньше или равно 40.

9.7. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t по каналам «JOE»/ «Yellow» /«HEX») и «ROX» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение $Ct\ BKO$ превышает значение $(Ct\ BKO)_{cp}$ 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 каналам «JOE»/ «Yellow» /«HEX»), «ROX»/ «Orange» 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 техниче-

ских 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.

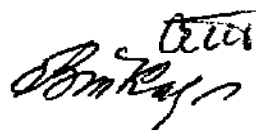
Начальник отделения

ЗАО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

«СОГЛАСОВАНО»

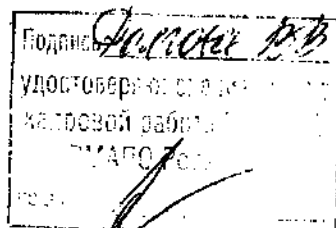
зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики

ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»



д.м.н., профессор Долгов В.В.

20 г.





Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
Росси листов

В (Директор & А.)