

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ООО «НПО «Генлаб»
Земляная Н.Ю.



« 25 » октября 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК ПЯТИ
ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
(« МУЛЬТИДЕНТ-5»)

2013 г.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов для определения ДНК пяти пародонтопатогенных микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции («Мультидент-5»), далее - Набор «Мультидент-5» предназначен для качественного выявления ДНК: Превотелла интермедиа (*Prevotella intermedia*), Бактероидес форситус (*Bacteroides forsythus*), Трепонема дентикола (*Treponema denticola*), Актинобациллюс актиномицетемкомитанс (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), Порфиромонас гингивалис (*Porphyromonas gingivalis*) в десневой жидкости.

1.2 Набор предназначен только для применения *in vitro*.

1.3 Набор реагентов «Мультидент-5» может быть использован в клинической диагностике пародонтита и других заболеваний полости рта, а также для оценки эффективности терапии.

2 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Производится лизис анализируемых образцов при помощи пробоподготовки «Реалекс», затем выполняется полимеразная цепная реакция (ПЦР): методом амплификации *ин витро* в течение нескольких часов выделяется и размножается определенная последовательность ДНК в количестве, превышающем исходную в 10^8 раз. При мультипраймерной амплификации используют олигонуклеотидные праймеры (затравки), фланкирующие участки ДНК, специфичные для фрагментов геномов каждого возбудителя. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой.

Детекцию результатов осуществляют при помощи электрофореза продуктов ПЦР в агарозном геле. Окрашенную этидиум бромидом ДНК в геле просматривают под ультрафиолетовым излучением, используя трансиллюминатор. По наличию специфических фрагментов амплификации судят о присутствии определенных возбудителей в анализируемом материале.

Регистрацию результатов проводят визуально или с помощью документирующей системы.

3 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

3.1 Специфичность.

При постановке мультипраймерной реакции в (+)-контроле и в образцах, содержащих ДНК одного или нескольких определяемых возбудителей, должны быть видны полосы, размеры которых должны соответствовать размерам амплификационных фрагментов определяемых возбудителей. В (-) контроле и в отрицательных образцах данные полосы должны отсутствовать.

3.2 Чувствительность.

Чувствительность набора составляет 10^4 копий/мл биологической жидкости для каждого возбудителя.

3.3 Время проведения анализа после приготовления растворов составляет не более 5 ч.

3.4 Набор рассчитан на проведение анализа 40 неизвестных образцов, 5 проб положительного контрольного образца ДНК и 5 проб отрицательного контрольного образца (всего 50 определений).

3.5 Срок годности набора 6 месяцев со дня выпуска.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.2 Меры предосторожности - соблюдение "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г.).

4.3 При работе с анализируемыми образцами следует использовать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки. При работе с агарозным гелем, содержащим этидиум бромид следует использовать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки. Просмотр геля в ультрафиолетовом свете обязательно следует проводить через защитное стекло.

4.4 Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.5 Следует использовать отдельные комплекты полуавтоматических пипеток для различных стадий анализа.

4.6 Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и

удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.7 Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790–10. «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

5 СОСТАВ НАБОРА

Набор Набор «Мультидент-5» состоит из трех комплектов :

а) Комплект I (реагенты для пробоподготовки) включает:

- **Реалекс** (суспензия смеси ионообменников) – 1 флакон (5 мл);

б) Комплект II (реагенты для амплификации), включающий:

- **ПК** (положительный контрольный образец ДНК), готов к применению – 1 пробирка (30 мкл);

- **ОК** (отрицательный контрольный образец), готов к применению – 1 пробирка (30 мкл);

- **Супермикс** (реакционная смесь), готов к применению – 2 пробирки (по 550 мкл);

- **Полимеразу** (термостабильная ДНК-полимераза), готова к применению – 1 пробирка (60 ед);

- **Буфер для полимеразы** (буфер для разведения ДНК-полимеразы), готов к применению – 1 пробирка (100 мкл);

- **Масло** (вазелиновое масло), готово к применению – 1 флакон (5,0 мл).

б) Комплект III (реагенты для электрофореза), включающий:

- **Буфер для электрофореза** – 1 пакет (17 г);

- **Агарозу** – 2 пакета (по 2 г);

- **Этидиум бромид** – 1 пробирка (50 мкл).

6 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ламинарный бокс;

- ПЦР - бокс;

- программируемый термостат (амплификатор);

- прибор для электрофореза с принадлежностями;

- ультрафиолетовый трансиллюминатор;

- микроцентрифуга, развивающая ускорение 10000 g;
- термостат для пробирок, поддерживающий температуру $95 \pm 1^\circ\text{C}$;
- вихревой смеситель (вортекс);
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 - 10 мкл; 5,0 - 40,0 мкл; 40,0 - 200,0 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования;
- секундомер;
- холодильник бытовой;
- морозильник;
- колба коническая вместимостью 300; 1000 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 100; 1000 мл;
- колба термостойкая вместимостью 350 мл;
- плитка электрическая;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- спирт этиловый 70%;
- одноразовые пластиковые или резиновые перчатки хирургические.

7 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Исследуемым материалом для проведения анализа является содержимое зубодесневого (пародонтального) кармана. Материал следует отбирать до проведения антибиотикотерапии или не ранее, чем через месяц после ее окончания. Не следует отбирать образцы из патологических карманов, выделяющих гной. По возможности избегать загрязнения образцов кровью.

7.1 Перед взятием образцов следует удалить наддесневые отложения (супрагингивальную бляшку) стерильными кюретками.

7.2 Место отбора образца осушить с помощью стерильного шарика ваты.

7.3 Используя пару стерильных пинцетов, ввести стерильный бумажный зонд в десневой желобок (пародонтальный карман) так, чтобы исключить контакт со слизистой, поверхностью эмали или коронкой зуба, затем опустить до основания слизистой.

7.4 Оставить зонд в этом положении на 10 – 20 секунд.

7.5 Перенести зонд в пробирку типа Eppendorf, содержащую 500 мкл физиологического раствора.

7.6 Перемешать содержимое пробирки, удалить зонд.

7.7 Хранить исследуемый материал в холодильнике при +4° С не более 3 суток.

НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ!

8 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Выделение ДНК из клинических образцов проводят при помощи пробоподготовки **Реалекс** (Комплект I), содержащей комплекс лизирующих реагентов и сорбентов, связывающих белки, липиды и др. компоненты клеток, при этом нуклеиновые кислоты остаются в растворе.

8.1 Выделение ДНК.

8.1.1 Пробирки с биоматериалом центрифугировать 10 мин при 10000 об/мин.

8.1.2 Осторожно, не задевая осадка, удалить супернатант с помощью микродозатора или колбы-ловушки.

Примечание.

1. При переходе от одной пробирки к другой следует обязательно менять наконечник!

2. При переходе от одной пробирки к другой следует обязательно протирать торец микродозатора 70% этиловым спиртом.

3. Супернатант из пробирки следует собирать в колбу с дезактивирующим раствором (3% раствор хлорамина или 5% раствор перекиси водорода).

4. Использованные наконечники следует помещать в дезактивирующий раствор (3% раствор хлорамина).

5. Осадки можно сразу использовать в работе или заморозить и хранить при минус 18°С 2-4 недели.

8.1.3 К осадкам добавить по 200 мкл **Реалекса**. Перед каждым внесением **Реалекса** его необходимо **перемешивать пипетированием** для того, чтобы в каждую пробу попало одинаковое количество сорбента.

8.1.4 Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе.

8.1.5 Инкубировать пробирки 10 мин при 56°С. После окончания инкубирования перемешать пробирки на вортексе 5 сек.

8.1.6 Инкубировать пробирки 10 мин при 99°С. После окончания инкубирования перемешать пробирки на вортексе 5 сек.

8.1.7 Тщательно перемешать содержимое пробирок на вортексе и центрифугировать при 10000 об/мин 30 сек. Выделенная ДНК находится в супернатанте.

Пробы готовы для проведения амплификации. Их можно хранить при минус 18°C в течение двух недель. В реакцию амплификации использовать 5 мкл супернатанта проб.

9 АМПЛИФИКАЦИЯ

9.1 Приготовить и промаркировать амплификационные пробирки для клинических образцов, (+) и (-) контролей.

9.2 В пробирки для образцов внести по 5 мкл ДНК проб.

Примечание: при переходе от одного клинического образца к другому следует обязательно менять наконечники!

9.3 Вынуть из морозильника и разморозить при комнатной температуре **Комплект II Набора**.

9.4 В пробирку для (-)- контроля внести 5 мкл **ОК**.

9.5 **Полимеразу** развести **Буфером для полимеразы** до концентрации 1ед/мкл (схема разведения прилагается к каждому набору). Тщательно перемешать аккуратным пипетированием не менее 7 раз.

9.6 Тщательно перемешать **Супермикс** и отобрать необходимый объем из расчёта 21 мкл на одну реакцию в чистую пробирку. Расчёт объемов **Супермикса** на различное количество реакционных пробирок с учетом (+) и (-)-контролей приведён в таблице 1.

9.7 В отобранный объем **Супермикса** добавить **Разведенную полимеразу** из расчета 1 мкл на реакцию (см. табл.1). Тщательно перемешать.

Таблица 1.

Приготовление Реакционной смеси.

Количество пробирок	4	5	6	7	8	9	10
Объем Супермикса, мкл	84	105	126	147	168	189	210
Объем Разведенной полимеразы, мкл	4	5	6	7	8	9	10

9.8 Внести в каждую амплификационную пробирку (включая (+) и (-) контроли) по 22 мкл полученной **Реакционной смеси**.

9.9 В каждую пробирку капнуть по 1-2 капли **Масла вазелинового** так, чтобы оно полностью покрывало поверхность **Реакционной смеси**.

Примечание. Для предотвращения перекрестной контаминации при внесении **Реакционной смеси** и **Масла** не допускать соприкосновения наконечника пипетки с амплификационной пробиркой.

9.10 Внести в амплификационную пробирку для (+) контроля 5 мкл **ПК** под **Масло**.

9.11 Поместить пробирки с пробами и контролями в предварительно про-гретый до 95°C программируемый термостат (амплификатор «Терцик», фирма «ДНК-технология», Россия) и провести амплификацию в режиме регулирования темпера-туры «Матрица» по следующей программе:

95°C – 2 мин – 1 цикл

95°C – 30 сек

62°C – 30 сек - 32 цикла

72°C – 40 сек

72°C – 2 мин - 1 цикл

Примечание. Данная программа подобрана **только** для амплификатора «Терцик» при использовании **тонкостенных** амплификационных пробирок фирмы «Sarstedt», Германия (кат.№ REF 72.735.002). При использовании в работе других амплификаторов или других амплификационных пробирок возможно изменение программы амплификации.

9.12 После окончания амплификации пробирки перенести в комнату детекции результатов для проведения электрофореза.

10 ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

10.1 Приготовление реагентов для электрофореза.

10.1.1 Приготовление электрофоретического буфера (ЭФБ).

Содержимое пакета с навеской **Буфера для электрофореза** перенести в колбу коническую вместимостью 2000 мл. и добавить 2000 мл. воды дистиллированной, тщательно перемешать до полного растворения порошка. ЭФБ можно хранить при комнатной температуре (+18-25°C) не более 6 месяцев.

10.1.2 Приготовление агарозного геля.

В колбу термостойкую вместимостью 350 мл добавить 100 мл. ЭФБ и внести содержимое одного пакета с **Агарозой** (2 г). Поместить колбу термостойкую на электрическую плитку, довести содержимое колбы до кипения и после того, как агароза полностью раствориться (через 10-20 мин), колбу с расплавленной агарозой снять с плитки. Полученный раствор агарозы должен быть прозрачным и не содержать

отдельных нерасплавленных частиц. Расплавленную агарозу охладить при комнатной температуре (+18-25°C) примерно до температуры +50°C. В колбу с расплавленной агарозой добавить 5 мкл. **Этидиума бромид** и осторожно перемешать содержимое колбы равномерными вращательными движениями. Установить гребенку на платформу, находящуюся в заливочной ванночке, и залить расплавленную агарозу в платформу так, чтобы толщина геля составляла примерно 4 мм.

После застывания агарозы (примерно через 30-40 мин) залить поверхность геля ЭФБ, осторожно вынуть гребенку, платформу с гелем перенести из ванночки в электрофоретическую камеру, заполнить ее ЭФБ так, чтобы буфер покрывал агарозный гель слоем примерно 5 мм.

10.2 Проведение электрофореза.

10.2.1 В лунки агарозного геля под буферный раствор внести из-под **Масла** по 14 мкл содержимого амплификационных пробирок.

10.2.2 Подключить камеру для электрофореза к источнику питания и задать напряжение 150 в. Направление движения нуклеиновых кислот при электрофорезе – от минуса к плюсу.

10.2.3 Электрофорез следует прекратить после того, как краска для электрофореза голубого цвета (ксиленцианол) отойдет от старта не менее, чем на 2 см, а краска желтого цвета (оранж G) не менее, чем на 7 см.

10.2.4 Камеру отключить от источника питания и осторожно перенести платформу с гелем на стекло трансиллюминатора.

Примечание. Работать с агарозным гелем и этидиумом бромидом следует обязательно в резиновых перчатках!

10.2.5 Осторожно переместить гель с платформы на стекло трансиллюминатора, включить трансиллюминатор и проанализировать гель.

Примечание. Просмотр геля обязательно следует проводить через защитное стекло, так как ультрафиолетовый свет опасен для глаз.

11 УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1 В (+)-контроле должны быть видны пять светящихся полос, размеры которых должны соответствовать размерам ПЦР-продуктов определяемых возбудителей (длины фрагментов приведены в таблице 2).

Таблица 2.

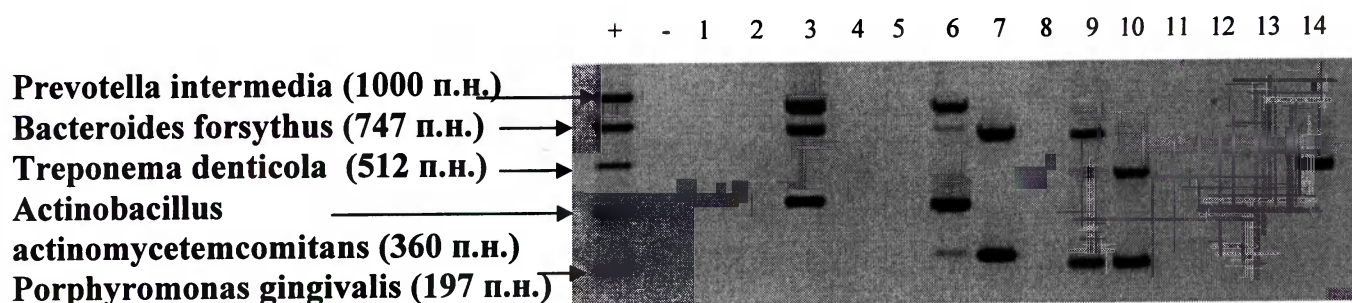
Размеры ПЦР-продуктов возбудителей, входящих в состав набора.

Наименование возбудителя	Размер ПЦР-продукта (пар нуклеотидов)
Превотелла интермедиа (<i>Prevotella intermedia</i>)	1000
Бактероидес форситус (<i>Bacteroides forsythus</i>)	747
Трепонема дентикола (<i>Treponema denticola</i>)	512
Актонобациллюс актиномицетемкомитанс (<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>)	360
Порфиромонас гингивалис (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	197

11.2 В (-)-контроле светящиеся полосы должны отсутствовать. Появление полос в отрицательном контрольном образце является сигналом некорректно выполненного анализа или загрязнения исходных компонентов набора.

11.3 В анализируемых пробах в качестве положительных ответов следует учитывать полосы, находящиеся строго на уровне одной из контрольных полос, при этом интенсивность свечения полос в анализируемых пробах должна быть больше или равна интенсивности свечения полос в положительном контроле. Если интенсивность свечения полосы в пробе меньше контрольной, это означает, что концентрация соответствующего возбудителя в данной пробе находится в пределах нормы (в положительном контроле концентрация для каждого возбудителя составляет 10^4 копий/мл). Отсутствие полос на уровне контрольных свидетельствует о том, что в анализируемой пробе данных возбудителей нет.

Ниже приведена электрофореграмма одной из постановок на наборе «Мультидент-5».



+ - положительный контрольный образец;
 - - отрицательный контрольный образец;

В образце №3 определяется три возбудителя - Превотелла интермедиа, Бактероидес форситус и Актинобациллюс актиномицетемкомитанс; в образце №6 - Превотелла интермедиа и Актинобациллюс актиномицетемкомитанс. Кроме того в образце №6 видны фрагменты, соответствующие Бактероидес форситус и Порфиромонас гингивалис, однако интенсивность свечения полос меньше контрольных, т.е. концентрация данных возбудителей в пробе менее 10^4 копий/мл, что находится в пределах нормы. В образце №7 и №9 определяются Бактероидес форситус и Порфиромонас гингивалис, кроме того в образце №9 видны полосы, соответствующие фрагментам Превотелла интермедиа и Трепонема дентикола, однако, концентрация данных возбудителей в этой пробе находится в пределах нормы. В образце №10 определяются Трепонема дентикола и Порфиромонас гингивалис, в образце №14 - только Трепонема дентикола. Все остальные образцы отрицательные.

12. Утилизация.

12.1 Утилизация использованных пробирок, наконечников, перчаток, ветоши для обработки столов, а также электрофоретического буфера из камеры и отработанных агарозных гелей, содержащих этидиум бромид, проводится в соответствии с МУ 1.3. 2569 -09 («Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности»). Приложение 6).

12.2 Использованные наконечники, пробирки с ампликонами (не открывать), перчатки, ветошь после окончания работы помещают в плотный термостойкий пакет (контейнер) для последующего автоклавирования под давлением 2,0 кгс/кв. см (0,2 МПа) при температуре 132 ± 2 °C в течение 60 мин.

12.3 После автоклавирования пакет с инаktivированным материалом выносят в контейнер для мусора с последующим вывозом на полигон бытовых отходов.

12.4 Отработанные агарозные гели и электрофоретический буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л. с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4 - 6 ч. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Необходимые реагенты для

обработки 1 л буфера и гелей: 0,5 М перманганат калия - 1 л; 2,5 М соляная кислота - 1 л; 2,5 М NaOH - 1 л.

12.5 Нейтрализованные реактивы сбрасывают в канализацию.

13 Условия хранения и эксплуатации набора.

13.1 Комплект I набора и Масло должны храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8°C в течение всего срока годности.

13.2 Комплект II набора (все компоненты кроме Масла) должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре минус 20°C в течение всего срока годности.

13.3 Буфер для электрофореза и Агароза должны храниться в упаковке предприятия-изготовителя при комнатной температуре (+18-25°C) в течение всего срока годности.

Этидиум бромид должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при комнатной температуре (+18-25°C) в темном месте в течение всего срока годности.

13.4 Срок годности набора - 6 мес со дня приемки ОТК предприятия –изготовителя.

13.5 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

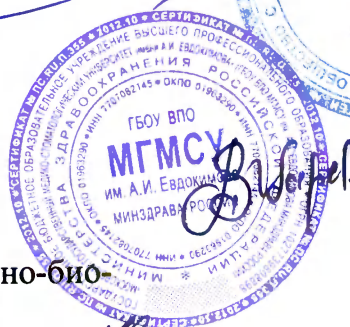
По вопросам, касающимся качества набора «Мультиидент-5» следует обращаться в ООО «НПФ «Генлаб»» по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 10, офис 405., тел./факс 8-499-744-46-06

Генеральный директор
ООО «НПФ «Генлаб»


Земляная Н.Ю.

Директор НИМСИ, заведующий
кафедрой микробиологии МГМСУ,
профессор


Царев В.Н.

Заведующая лабораторией молекулярно-биологических исследований НИМСИ,
профессор


Николаева Е.Н.

СОГЛАСОВАНО

Заведующий кафедрой

КДЛ ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

д.м.н., профессор


Долгов В.В.

«24» февраля 2014 г.

Сшито и заверено печатью 18

Ген. директор ООО «НПО
«Генлаб»

Земляная Н.Ю.

Исполнительный директор
«Генлаб»

ООО «НПО «Генлаб»

Исполнительный директор
«Генлаб»