

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

Федерального

государственного

учреждения

науки «Центральный научно-

исследовательский институт

эпидемиологии» Федеральной

службы по надзору в сфере защиты

прав потребителей и благополучия

человека

В.И. Покровский

«12» октября 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК *Toxoplasma gondii* в клиническом

материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

«АмплиСенс® *Toxoplasma gondii*-FL»

« УТВЕРЖДАЮ »

Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации

_____ Г.Г. Онищенко

« _____ » _____ 2009 г.

№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления ДНК *Toxoplasma gondii* в клиническом
материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Toxoplasma gondii*-FL»

«СОГЛАСОВАНО»

И.О.директора ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича
Роспотребнадзора

А.А.Мовсисянц

《 人 》

2009 г.

Оглавление

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.	3
СОСТАВ.	4
НАЗНАЧЕНИЕ.	6
ПРИНЦИП МЕТОДА.	7
ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.	8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.	10
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.	11
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.	13
ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.	13
ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР- АМПЛИФИКАЦИИ.	14
АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.	15
ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.	17
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.	17
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ.	18

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ПКО	Положительный контрольный образец
ОКО	Отрицательный контрольный образец
ВКО	Внутренний контрольный образец
Физраствор	Физиологический раствор
PBS	Фосфатный буфер

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 1 варианте.

Вариант FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «РИБО-преп» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант FRT-50F;

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F;

Форма 3 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой 2 и 3 гарантируются только в случае применения дополнительного комплекта реагентов «РИБО-преп» и «ДНК-сорб-С» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 50 (ТУ 9398-071-01897593-2008) – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная бесцветная жидкость*	15	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	22,5	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки

Комплект реагентов вариант 50 рассчитан на выделение ДНК из 50 проб, включая контроли.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-50 F – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Toxoplasma gondii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Toxoplasma gondii</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ПКО ДНК <i>Toxoplasma gondii</i> и STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	1 пробирка

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Toxoplasma gondii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
---------	----------	------------	--------

* При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °C возможно образование осадка в виде кристаллов.

ПЦР-смесь-1-FRT <i>Toxoplasma gondii</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
ПКО ДНК <i>Toxoplasma gondii</i> и STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 200 реакций амплификации, включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	4 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	1,0	3 пробирки

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов «АмплиСенс® *Toxoplasma gondii*-FL» предназначен для выявления ДНК *Toxoplasma gondii* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Формы комплектации 1 предназначена для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала и проведения ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Формы комплектации 2 и 3 предназначены для проведения ПЦР-амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или «ДНК-сорб-С» (ТУ 9398-075-01897593-2008), производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, для выделения ДНК из клинического материала.

Аналитическая чувствительность набора реагентов составляет 400 копий/мл ДНК *Toxoplasma gondii*.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Метод выявления ДНК *Toxoplasma gondii* в клиническом материале, основан на:

- а) выделении тотальной ДНК из белых клеток периферической и пуповинной крови; спинномозговой жидкости, биопсийного и аутопсийного материала, амниотической жидкости совместно с ДНК экзогенного внутреннего контрольного образца;
- б) одновременном проведении реакции амплификации (мультиплекс-ПЦР) участка ДНК неструктурного повторяющегося гена размером 529 п.н., кодирующего белок *Toxoplasma gondii* и искусственно сконструированного фрагмента ДНК, клонированного в ДНК фаг-λ, используемого в качестве **экзогенного неконкурентного** внутреннего контроля с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Результат амплификации ДНК *Toxoplasma gondii* регистрируется по каналу флуоресценции **Yellow/JOE/HEX**, результат амплификации экзогенного неконкурентного внутреннего контроля регистрируется по каналу флуоресценции – **Green/FAM**.

Использование **экзогенного** внутреннего контроля позволяет контролировать основные процессы ПЦР-анализа (выделение ДНК, проведение реакции амплификации ДНК). Преимуществом использования **неконкурентного** внутреннего контроля является увеличение линейного диапазона измерения и, как следствие, увеличение аналитической чувствительности теста.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Для проведения анализа используется следующий материал:

– цельная периферическая и пуповинная кровь

Взятие цельной периферической крови проводится утром натощак в пробирку с 6% раствором ЭДТА в соотношении 20:1 (20 частей крови на 1 часть ЭДТА), взятие пуповинной крови осуществляют при проведении кордоцентеза. Закрытую пробирку с цельной периферической и/или пуповинной кровью несколько раз переворачивают для равномерного перемешивания с ЭДТА. Допускается хранение цельной периферической и пуповинной крови в течение 12 ч при температуре от 20 до 25 °С и в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С.

Замораживание образцов цельной крови недопустимо!

– белые клетки (лейкоцитарная масса) периферической и/или пуповинной крови

Получают из цельной периферической и/или пуповинной крови. Для получения в 1,5 мл пробирку типа «Эппендорф» внести отдельными наконечником 1,0 мл гемолитика (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) и 0,25 мл цельной крови. Аккуратно перемешивают содержимое пробирки на вортексе. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, оставляя над осадком 100 мкл жидкости. После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розового цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов).

Примечание – К полученному осадку лейкоцитов добавить 300 мкл раствора для лизиса. Допускается хранение лизированного осадка образцов при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 сут; при необходимости хранения более 1 сут – при температуре не выше минус 16 °С.

– биопсийный и аутопсийный материал

Взятие материала осуществляют из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с повреждением участка. Биопсийный материал помещают в одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 2 мл, содержащие 0,3 мл транспортной среды.

Допускается хранение образцов при комнатной температуре – в течение 6 ч; при температуре от 2 до 8 °С - в течение 3 сут; при необходимости хранения более 3 сут – при температуре не выше минус 16 °С.

Для проведения исследования необходимо поместить образец в стерильную фарфоровую ступку, добавить равный объем физраствора или PBS. Тщательно растереть фарфоровым пестиком для получения однородной суспензии клеток. Отобрать аликвоту 100 мкл в стерильную пробирку для выделения ДНК. Допускается хранение суспензии при температуре не выше минус 16 °С.

– спинномозговая жидкость

Взятие спинномозговой жидкости производится в стерильную пробирку типа «Эппендорф» – согласно стандартной методике.

Допускается хранение спинномозговой жидкости: при комнатной температуре – в течение 6 ч; при температуре от 2 до 8 °С - в течение сут, при температуре не выше минус 16 °С - в течение мес, при температуре не выше минус 68 °С - длительное хранение.

– **амниотическая жидкость**

Взятие амниотической жидкости производится в стерильную пробирку типа «Эппендорф» – при проведении амниоцентеза согласно стандартной методике.

Для проведения исследования необходимо провести предобработку анализируемого материала. Образец амниотической жидкости тщательно ресуспендировать. Автоматическим дозатором, используя наконечник с фильтром, отобрать 1 мл материала и перенести в новую стерильную пробирку типа «Эппендорф» для проведения центрифугирования при 8-9 тыс g (12-13 тыс об/мин в центрифуге на 12 мест) в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отобрать, используя наконечник с фильтром, оставляя над осадком 200 мкл жидкости, затем ресуспендировать материал на вортексе.

Допускается хранение амниотической жидкости и предобработанного материала в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 мес при температуре не выше минус 16 °С, длительное хранение – при температуре не выше минус 68 °С.

Для выделения ДНК рекомендуется использовать следующие комплекты реагентов производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора:

- «РИБО-преп» – для амниотической жидкости, спинномозговой жидкости, белых клеток (лейкоцитарная масса) периферической и/или пуповинной крови.
- «ДНК-сорб-С» (ТУ 9398-075-01897593-2008) – для биопсийного и аутопсийного материала.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
2. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером.
3. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
4. Анализ проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».
5. Все лабораторное оборудование, в том числе автоматические пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их из одного помещения в другое.
6. Поверхности столов, а также помещения до начала и после завершения работ необходимо облучать ультрафиолетовым светом в течение 30 мин.

mkob

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения ДНК из исследуемого материала требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
3. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
4. Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000мкл (например, «Ахуген», США).
6. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
7. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
8. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
9. Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 10 мкл и 200 мкл (например, «Ахуген», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения ПЦР-амплификации и гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов ПЦР-амплификации требуются:

1. Амплификатор например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «iQ5», «iQ iCycler» («BioRad», США) и «Mx3000P»/«Mx3005P» («Stratagene», США) или эквивалентный.
2. Для приборов с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»): одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Ахуген», США) для постановки в ротор на 36 пробирок или 0,1 мл («Corbett Research», Австралия) для постановки в ротор на 72 пробирки.

Для приборов с детекцией через крышку (например, «iQ5», «Mx3000P»): одноразовые

полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Ахуген», США).

3. ПЦР-бокс (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 100 и 200 мкл (например, «Ахуген», США).
8. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
10. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
11. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.

(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала).

Объем пробы, необходимый для выделения ДНК – 0,1 мл.

При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп».

Порядок работы.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный контроль). Внести в каждую пробирку по **10 мкл ВКО STI-87** (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции). Добавить в пробирки по **300 мкл раствора для лизиса**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с **раствором для лизиса** и **ВКО STI-87**, внести по **100 мкл** подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин при 65 °С** в термостате.
5. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **13 тыс об/мин**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин в течение 1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник **на 200 мкл** для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 2 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °C на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (ДНК-проба). Указанный материал готов к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C и в течение года при температуре не выше минус 16 °C.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции - 25 мкл, объем ДНК-пробы - 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы (ДНК-полимераза (TaqF)), которая активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °C в течение 15 мин.

Порядок работы:

А. Подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР.

1. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением эксперимента. Смешивать реагенты из расчета расходования на одну реакцию:

- 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *Toxoplasma gondii*
- 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT
- 0,5 мкл Полимеразы (TaqF)

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно согласно расчетной таблице (см. приложение 1). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку двух контрольных точек этапа амплификации ПЦР: положительного и отрицательного контролей ПЦР.

2. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации исследуемых и контрольных образцов ДНК. Тип пробирок, стрипов или планшетов выбрать в зависимости от используемого прибора. Раскапать в пробирки по 15 мкл готовой реакционной смеси.
3. В пробирки с реакционной смесью добавить по 10 мкл ДНК-пробы, выделенной из клинических или контрольных образцов.
4. Поставить контрольные реакции амплификации:
- а) **отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
 - б) **положительный контроль (К+)** – внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI.
5. Установить пробирки в реакционный модуль.

Б. Проведение амплификации.

1. Установить пробирки в реакционный модуль.
2. Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию для данного прибора.

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа¹

Этап	Температура, °C	Продолжительность Этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	—	1
2	95	5 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	15 с	—	
3	95	5 с	—	40
	60	20 с	FAM/Green, JOE/Yellow	
	72	15 с	—	

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа²

Этап	Температура, °C	Продолжительность этапа	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	15 мин	—	1
2	95	5 с	—	5
	60	20 с	—	
	72	15 с	—	
3	95	5 с	—	40
	60	30 с	FAM, HEX/JOE,	
	72	15 с		

3. По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам **FAM/Green** и **JOE/HEX/Yellow** – анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

По каналу – **FAM/Green** – регистрируется накопление продукта амплификации участка ДНК **STI (ВКО)**, по каналу – **JOE/HEX/Yellow** – ДНК *Toxoplasma gondii* (**ПКО**).

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов.

Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в реальном времени S-образный вид, однократно

¹ Например, RotorGene 3000 и RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия)

² Например, iQiCycler, iQ5 (BioRad, США), Mx3000P (Stratagene, США)

пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, и значение порогового цикла (Ct или Cp) для канала FAM/Green менее 30, а для канала JOE/Yellow/HEX менее 40, *отрицательным* в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения Ct или Cp), *сомнительным* во всех других случаях.

(см. также инструкции к соответствующим приборам для ПЦР в реальном времени и методические рекомендации по применению набора реагентов для выявления ДНК *Toxoplasma gondii* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Toxoplasma gondii*-FL»).

Возможные ошибки.

1. Появление любого значения «Ct» на канале JOE/Yellow/HEX (*Toxoplasma gondii*) и/или FAM/Green (ВКО STI-87) в таблице результатов для отрицательного контроля этапа ПЦР (К-) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ всех проб, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.
2. Если значение «Ct» в таблице результатов для положительного контроля (К+) ПЦР ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI по каналу JOE/Yellow/HEX (*Toxoplasma gondii*) и/или FAM/Green отсутствует – результаты анализа по всем образцам считаются недействительными. Необходимо повторить анализ всех образцов с этапа ПЦР.
3. Значения «Ct» на канале FAM/Green (внутренний контроль) в таблице результатов для исследуемых образцов отсутствуют – сбой этапа выделения. Необходимо повторить анализ для этих образцов, начиная с этапа выделения. Если для анализируемого образца значение «Ct» ВКО превышает 30 цикл, а значение «Ct» ДНК *Toxoplasma gondii* больше 40, то необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения. Высокие значения «Ct» могут быть вызваны потерями ДНК при выделении или наличием ингибиторов.
4. Клинические образцы, в которых появились значения «Ct» по каналу JOE/Yellow/HEX (*Toxoplasma gondii*) не превышающие 40 циклов, считаются положительными. Если значение «Ct» в пробе превышает этот порог, то результат считается сомнительным, необходимо провести дополнительное исследование данного образца ДНК в двух повторах. В случае получения воспроизводимого положительного значения «Ct» – результат считать положительным. При получении невоспроизводимых в двух повторах значений – результат считается сомнительным.

автоматически рассчитывает и представляет результаты либо в виде копий/мл или lg (копий/мл); либо в виде международных единиц на мл (IU/ml) или lg (IU/ml).

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «МАГНО-сорб» хранить при температуре от 2 до 25 °С. Комплект реагентов для автоматической станции выделения нуклеиновых кислот «NucliSENS® easyMAG™» («bioMérieux», Франция) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT и «Комплект для калибровки» хранить при температуре не выше минус 10 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® ВИЧ-Монитор-М-FL» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (499) 241-39-22, факс (499) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 974-96-42, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru) или ОРРиО тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

Общий объем реакции - 25 мкл Объем реагентов в 1 реакцию - 15 мкл Объем ДНК-пробы - 10 мкл			
Количество исследуемых клинических образцов с учетом контролей*	ПЦР-смесь-1- FRT <i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i> , (мкл)	ПЦР-смесь-2-FRT (мкл)	Полимераза (TaqF), (мкл)
1	40	20	2,0
2	50	25	2,5
3	60	30	3,0
4	70	35	3,5
5	80	40	4,0
6	90	45	4,5
7	100	50	5,0
8	110	55	5,5
9	120	60	6,0
10	130	65	6,5
11	140	70	7,0
12	150	75	7,5
13	160	80	8,0
14	170	85	8,5
15	180	90	9,0
16	190	95	9,5
17	200	100	10,0
18	210	105	10,5
19	220	110	11,0
20	230	115	11,5
21	240	120	12,0
22	250	125	12,5
23	260	130	13,0
24	270	135	13,5
25	280	140	14,0
26	290	145	14,5
27	300	150	15,0
28	310	155	15,5
29	320	160	16,0
30	330	165	16,5

* Приведены значения с учетом запаса (расчет на одну реакцию больше) и с учетом необходимости постановки двух контрольных точек (положительного и отрицательного контролей прохождения реакции амплификации ДНК).