

« УТВЕРЖДАЮ »

КОПИЯ ВЕРНА

Н.А. Сёмина

Зам. директора

ФГУН ЦНИИЗ «СпотребнаДер»

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения
и социального развития

Р.У. Хабриев

2006 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению

Набора реагентов для выявления ДНК микроорганизмов рода *Ureaplasma* (*Ureaplasma spp.*) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® *Ureaplasma spp.*–FL»

Набор реагентов выпускается в виде двух комплектов : «АмплиСенс» вариант FEP или «АмплиСенс» вариант FRT.

«АмплиСенс» вариант FEP – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК микроорганизмов рода *Ureaplasma* (*Ureaplasma spp.*) с гибридизационно-флуоресцент-ной детекцией по «конечной точке».

Для ПЦР-реакции используется термоциклер (амплификатор) (например, «Терцик» производства «ДНК-Технология», Россия, «GeneAmp PCR System 2700» производства «Applied Biosystems», США). Для детекции используется флуоресцентный ПЦР-детектор (например, «Джин» производства «ДНК-Технология», Россия, «АЛА-1/4» производства «BioSan», Латвия).

«АмплиСенс» вариант FRT – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК микроорганизмов рода *Ureaplasma* (*Ureaplasma spp.*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Для проведения ПЦР-анализа используется термоциклер (амплификатор) с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени (например, «Rotor-Gene 3000» или «Rotor-Gene 6000» производства «Corbett Research», Австралия, «iQ iCycler» производства «Bio-Rad», США).

ФОРМА ВЫПУСКА.

Комплект «АмплиСенс» вариант FER включает:

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во (шт)
ПЦР-смесь-1-FER <i>Ureaplasma spp.</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	110 пробирок
ПЦР-смесь-2-Flu	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР*	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 пробирка или капельница
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Ureaplasma species</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект рассчитан на постановку 110 реакций, включая контрольные образцы.

*Реагент используется при применении амплификаторов без термостатируемой крышки (например, «Терцик» производства «ДНК-Технология», Россия)

Комплект «АмплиСенс» вариант FRT включает

Реактив	Описание	Объем (мл)	Кол-во (шт)
ПЦР-смесь-1-FRT <i>Ureaplasma spp.</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	110 пробирок
ПЦР-смесь-2-Flu	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПКО ДНК <i>Ureaplasma species</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект рассчитан на постановку 110 реакций, включая контрольные образцы.

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов «АмплиСенс® *Ureaplasma spp.-FL*» предназначена для выявления ДНК микроорганизмов рода *Ureaplasma (Ureaplasma spp.)* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Набор рассчитан на 110 постановок, включая контрольные образцы.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ.

Перед началом работы следует ознакомиться с «Методическими рекомендациями по взятию, транспортировке, хранению и пробоподготовке биологического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ЦНИИЭ МЗ РФ (Москва, 2003).

Материалом для исследования служат: соскобы (мазки) слизистых оболочек урогенитального тракта, осадок клеток первой порции утренней мочи, секрет предстательной железы.

Для выделения ДНК микроорганизмов рода *Ureaplasma* (*Ureaplasma spp.*) из клинического материала следует использовать комплекты реагентов «ДНК-сорб-А» или «ДНК-сорб-АМ» (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Если материалом для исследования служит секрет предстательной железы, то для выделения ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

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.

1. Работать только в одноразовых перчатках, использовать одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
2. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо облучать ультрафиолетовым светом.
3. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается переносить их с одного рабочего места на другое.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА

Для этапа амплификации и детекции ДНК требуются:

1. Для комплекта реагентов «АмплиСенс» вариант FEP: флуоресцентный ПЦР-детектор «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия).
2. Для комплекта реагентов «АмплиСенс» вариант FEP: амплификатор (термоциклер), например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) при работе с ПЦР-детектором «Джин»; например, «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems», США), или «Gradient Palm Cycler» («Corbett Research», Австралия), или «Uno-2» («Biometra», Германия), или «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) при работе с ПЦР-детектором «АЛА-1/4».
3. Для комплектов реагентов «АмплиСенс» вариант FRT: амплификатор с детекцией в режиме «реального времени» «Rotor-Gene 3000» или «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия), или «iQ iCycler» («Bio-Rad», США).

4. ПЦР-бокс (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», фирмы «Биоком», Россия).
6. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые наконечники для микропипеток до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
8. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 100 мкл в штативах (например, «Ахуген», США).
9. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных ДНК.
11. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
12. Емкость для сброса наконечников.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКТА «АмплиСенс» вариант FER

АМПЛИФИКАЦИЯ УЧАСТКА ДНК (МЕТОД ПЦР) И ИЗМЕРЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТ- НОГО СИГНАЛА ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

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

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FER *Ureaplasma sp.* для амплификации исследуемых и контрольных проб.
2. В пробирки с ПЦР-смесью-1-FER *Ureaplasma sp.* на поверхность застывшего воска раскатать по 7 мкл ПЦР-смеси-2-Flu, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FER *Ureaplasma sp.*
3. На поверхность добавить каплю минерального масла (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
4. Приготовить контрольный образец «Фон». Для этого в пробирку с ПЦР-смесью-1-FER *Ureaplasma sp.* на поверхность застывшего воска внести 17 мкл ПЦР-смеси-Фон, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FER *Ureaplasma sp.* На поверхность добавить каплю минерального масла для ПЦР масла (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).

Примечание: При анализе более 15 образцов рекомендуется приготовить и использовать 2 контрольных образца «Фон».

5. В готовые пробирки внести по 10 мкл ДНК-проб, выделенных из клинических или контрольных проб.

Примечание. Не используемые в данный момент пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP *Ureaplasma sp.* следует хранить в защищенном от света месте.

6. Поставить контрольные реакции амплификации:

а) отрицательный контрольный образец (К-) – вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.

б) положительный контрольный образец (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКД ДНК *Ureaplasma species*.

Б. Проведение амплификации (ПЦР):

Запустить на амплификаторе соответствующую программу «65-60-45» (см. табл. 1). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Примечание. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).

Таблица 1.

Программа для амплификации участка ДНК микроорганизмов рода *Ureaplasma* (*U. urealyticum* и *U. parvum*):

	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):									Амплификаторы с матричным регулированием темпера- туры «Uno-2» («Bio- metra»))		
	«Терцик» («ДНК- Технология»))			«GeneAmp PCR Sys- tem 2700» («Applied Biosystems»))			«Gradient Palm Cycler» («Corbett Research»))					
цик л	тем- пера- тура	время	цик лы	тем- пера- тура	время	цик- лы	тем- пера- тура	время	цик- лы	тем- пера- тура	время	Цик лы
0	95 °С	Пауза		95 °С	Пауза		95 °С	Пауза		95 °С	Пауза	
1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1	95 °С	5 мин	1
2	95 °С	10 с	35	95 °С	20 с	20	95 °С	20 с	20	95 °С	25 с	20
	65 °С	10 с		65 °С	25 с		65 °С	20 с		65 °С	40 с	
	72 °С	10 с		72 °С	30 с		72 °С	25 с		72 °С	40 с	
3	95 °С	15 с	9	95 °С	20 с	24	95 °С	20 с	24	95 °С	25с	24
	60 °С	25 с		60 °С	30 с		60 °С	25 с		60 °С	40 с	
	72 °С	10 с		72 °С	30 с		72 °С	25 с		72 °С	40 с	
4	95 °С	15 с	1	95 °С	20 с	1	95 °С	20 с	1	95 °С	25 с	1
	60 °С	25 с		60 °С	30 с		60 °С	25 с		60 °С	40 с	
5	10 °С	Хранение		10 °С	Хранение		10 °С	Хранение		10 °С	Хранение	

Внимание! Выбор пробирок для амплификации зависит от используемых приборов:

- пробирки объемом 0,2 мл для амплификаторов «GeneAmp PCR System 2700», «Gradient Palm Cycler», «Uno-2» и ПЦР-детектора «АЛА-1/4»;
- пробирки объемом 0,5 мл для амплификатора «Терцик» и ПЦР-детекторов «Джин», «АЛА-1/4».

По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции результатов.

Примечание. Детекцию можно проводить и позже в течение 1 сут после окончания амплификации, если пробирки после окончания амплификации хранить в защищенном от света месте при температуре не более 28 °С.

В. Детекция и учет результатов с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора «Джин» или «АЛА-1/4» (путем измерения флуоресцентного сигнала).

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, согласно описанию в «Приложении к инструкции по применению набора реагентов «АмплиСенс® *Ureaplasma sp.*-Fl». Проведение детекции с помощью ПЦР-детектора и учет результатов» для используемого прибора.

Задать протокол измерения, последовательность тестируемых и контрольных образцов и запустить выполнение детекции. По окончании детекции сохранить полученные данные.

Полученные результаты интерпретируются автоматически с помощью программного обеспечения флуоресцентного ПЦР-детектора на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по каналу, назначенному для детекции продукта амплификации ДНК возбудителя и по каналу, назначенному для детекции продукта амплификации ДНК ВКО.

Примечание. ВКО-FL (внутренний контрольный образец) добавляется на стадии выделения ДНК.

Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 2).

Таблица 2.

Оценка результатов анализа контрольных точек.

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат
ОК	Выделение ДНК	отрицательный
К-	ПЦР	отрицательный
К+	ПЦР	положительный

Возможные ошибки:

1. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз для всех образцов.
2. Образцы, в которых отсутствует специфический сигнал как по каналу для детекции ДНК возбудителя так и по каналу для детекции ВКО требуют повторного проведения ПЦР и де-

текции. В случае, если повторно получен тот же результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения.

3. Если в отрицательном контроле (ОК или К-) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКТА «АмплиСенс» вариант FRT

АМПЛИФИКАЦИЯ УЧАСТКА ДНК (МЕТОД ПЦР) И ИЗМЕРЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО СИГНАЛА В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».

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

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FRT *Ureaplasma sp.* для амплификации исследуемых и контрольных проб.
2. В пробирки с ПЦР-смесью-1-FRT *Ureaplasma sp.* на поверхность застывшего воска раскатать по 7 мкл ПЦР-смеси-2-Flu, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FRT *Ureaplasma sp.*
3. В готовые пробирки внести по 10 мкл ДНК-проб, выделенных из клинических или контрольных проб.

Примечание. Не используемые в данный момент пробирки с ПЦР-смесью-1-FRT *Ureaplasma sp.* следует хранить в защищенном от света месте.

4. Поставить контрольные реакции амплификации:

- а) отрицательный контрольный образец (К-) – вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контрольный образец (К+) – внести в пробирку 10 мкл ПКД ДНК *Ureaplasma species*.

Б. Проведение амплификации (ПЦР)

Запрограммировать прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала согласно описанию в «Приложении к инструкции по применению набора реагентов «АмплиСенс® *Ureaplasma sp.*-FL» Проведение ПЦР в режиме «реального времени», анализ и учет результатов» для данного прибора. Установить пробирки в реакционный модуль и запустить выполнение программы.

По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

В. Анализ и учет результатов

Полученные данные - кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам - анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов). Анализ и учет результатов проводится согласно описанию в «Приложении к инструкции по применению набора реагентов «АмплиСенс® *Ureaplasma sp.*-FL». Проведение ПЦР в режиме «реального времени», анализ и учет результатов», соответствующем используемому прибору.

Анализируют результаты амплификации участка ДНК *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum* и ДНК ВКО.

Примечание. ВКО-FL добавляется на этапе выделения ДНК.

Накопление продукта амплификации участка ДНК *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum* детектируется по каналу для детекции флуорофора FAM, а накопление продукта амплификации ДНК ВКО - по каналу для детекции флуорофора JOE.

Результаты интерпретируются следующим образом:

- образец считается положительным, если в таблице результатов по каналу для детекции флуорофора FAM для него определено значение порогового цикла *Ct*. При этом кривая флуоресценции данного образца должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;

- образец считается отрицательным, если в таблице результатов по каналу для детекции флуорофора FAM для него не определено значение порогового цикла *Ct* (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию), а в таблице результатов по каналу для детекции флуорофора JOE для него определено значение порогового цикла *Ct*, не превышающее указанное (граничное) значение.

- образцы, для которых не определено (отсутствует) значение порогового цикла *Ct* как по каналу для детекции флуорофора FAM, так и по каналу для детекции флуорофора JOE получено значение *Ct*, превышающее указанное значение, требуют повторного проведения ПЦР и детекции. В случае, если повторно получен аналогичный результат, требуется повторить анализ образца, начиная с этапа выделения.

Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК (см. табл. 3).

Таблица 3.

Оценка результатов анализа контрольных точек.

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Значение Ct по каналу для детекции флуорофора FAM	Значение Ct по каналу для детекции флуорофора JOE	Результат
ОК	Выделение ДНК	Нет значений	Есть значение < указанного	отрицательный
К-	ПЦР	Нет значений	Нет значений	отрицательный
К+	ПЦР	Есть значение < указанного	Нет значений	положительный

Возможные ошибки:

1. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз.

2. Если в отрицательном контроле (ОК или К-) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 9 месяцев. Наборы реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат.

Транспортирование. В соответствии с СП 3.3.3.1248-03; транспортирование при температуре от 2 до 8 °С в течение 5 сут.

Хранение. В соответствии с СП 3.3.3.1248-03; хранение при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FEP *Ureaplasma sp.* и ПЦР-смесь-1-FRT *Ureaplasma sp.* хранятся в защищенном от света месте.

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

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *Ureaplasma spp.*-FL» направлять в ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002 г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41), тел./факс (495) 241-39-22, а также на предприятие-изготовитель ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а), тел. (495) 305-54-24, факс (495) 305-54-23.

Директор ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»
Роспотребнадзора



В.И. Покровский

Руководитель Государственных испытаний
Зав. лабораторией биохимии и биотехнологии
ФГУН ГИСК им.Тарасевича Роспотребнадзора

Р.А. Волкова