

ООО «АльфаЛаб»



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ООО «АльфаЛаб»


М.А.Суворова
« 11 » ноября 2013г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для обнаружения ДНК возбудителей протозойных инфекций
(*Lamblia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*)
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в образцах
биоматериала человека

«Прото-скрин»

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор «Прото-скрин» предназначен для качественного обнаружения ДНК простейших (*Lamblia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba hystolyica*).

Набор реагентов предназначен для выявления наиболее часто встречающихся у человека протозойных инвазий (лямблиоза, амебиоза, бластоцистной инвазии, криптоспориidioза, изоспороза). Перечисленные инфекции имеют общие пути заражения и могут иметь сходные клинические проявления (нарушения функций желудочно-кишечного тракта, аллергические реакции, повышенная утомляемость и др.), что обуславливает необходимость одновременного скрининга на наличие указанных возбудителей и проведения дифференциальной диагностики, в особенности у пациентов с иммунодефицитными состояниями.

Материалом для исследования являются фекальные образцы.

Для выявления возбудителей перечисленных заболеваний используется амплификация специфических участков ДНК методом ПЦР с применением специфических олигонуклеотидов и меченых олигонуклеотидных зондов Taqman. В присутствии фермента Taq-полимеразы происходит гибридизация олигонуклеотидов и зонда с комплементарным участком ДНК-мишени. Образование специфического продукта амплификации сопровождается отщеплением флуоресцентной метки (благодаря наличию у Taq-полимеразы 5'- экзонуклеазной активности) и появлению детектируемого флуоресцентного сигнала, регистрация которого проводится в режиме реального времени. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству специфических продуктов амплификации и, следовательно, нарастает с каждым последующим циклом.

Набор предназначен для использования на амплификаторах детектирующих для постановки полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (MiniOpticon, BioRad; ДТ-96 или другие амплификаторы с аналогичными техническими характеристиками).

Набор (каждый из вариантов) рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая положительные контрольные образцы ДНК простейших и отрицательные контрольные образцы.

Область применения набора – клиническая лабораторная диагностика, научные исследования. Только для исследований *in vitro*.

2. ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ.

«Прото-скрин» - набор для качественного обнаружения ДНК простейших (*Lamblia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba hystolyica*) в фекальных образцах методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме реального времени.

Выпускается в двух комплектациях, различающихся степенью готовности компонентов к постановке амплификации:

- а) комплект реагентов для амплификации (стрипованные пробирки 0,2 мл – раскапанный вариант).
- б) комплект реагентов для амплификации (нераскапанный вариант),

3. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

3.1. Принцип метода

Анализ образцов включает следующие этапы:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК из образцов биологического материала).
2. Постановка реакции ПЦР-амплификации.
3. Детекция продуктов амплификации.

3.2. Состав набора:

Сокращенные названия амплификационных смесей: «Lamb» - *Lambia Intestinalis*, «Bh» - *Blastocystis hominis*, «AmFr» - *Dientamoeba fragilis*, «IsoB» - *Isospora belli*, «Cr» - *Cryptosporidium parvum*, «EnHi» - *Entamoeba histolytica*, «ВК» - внутренний контроль.

«Прото-скрин» - набор для качественного обнаружения ДНК простейших включает:

- амплификационную смесь «ПЦР-смесь «Lamb»» - 2 пробирки в каждом стрипе по 10 мкл, всего 25 стрипов – раскапанный вариант, 1 пробирка 520 мкл – нераскапанный вариант.
- амплификационную смесь «ПЦР-смесь «Bh»» - 2 пробирки в каждом стрипе по 10 мкл, всего 25 стрипов – раскапанный вариант, 1 пробирка 520 мкл – нераскапанный вариант.
- амплификационную смесь «ПЦР-смесь «AmFr/IsoB»» - 2 пробирки в каждом стрипе по 10 мкл, всего 25 стрипов – раскапанный вариант, 1 пробирка 520 мкл – нераскапанный вариант.
- амплификационную смесь «ПЦР-смесь «Cr/EnHi»» - 2 пробирки в каждом стрипе по 10 мкл, всего 25 стрипов – раскапанный вариант, 1 пробирка 520 мкл – нераскапанный вариант.
- амплификационную смесь «ПЦР-смесь «ВК»» для обнаружения бактериальной ДНК, предназначенную для оценки качества выделения тотальной ДНК в анализируемых образцах, всего 7 стрипов - раскапанный вариант, 1 пробирка 520 мкл – нераскапанный вариант.
- раствор Taq-полимеразы - 5 пробирок по 520 мкл
- комплект положительных контрольных образцов (ПКО) - 5 пробирок по 30 мкл
- отрицательный контрольный образец – 1 пробирка 150 мкл

4. КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

4.1. Диагностическая чувствительность составляет 95,0% для каждого из показателей, определяемых с применением набора «Прото-скрин».

В качестве положительных образцов для определения диагностической чувствительности набора в отношении ДНК *Lambia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* были исследованы фекальные образцы, содержащие цисты указанных простейших по данным микроскопического анализа.

4.2. Диагностическая специфичность анализа при постановке тестов с применением набора «Прото-скрин» доказана методом секвенирования продуктов амплификации и подтверждена отсутствием перекрестных реакций между выявляемыми показателями.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. Меры предосторожности - соблюдение правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» 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».

4.4. Утилизация отходов производится в соответствии с СанПиН N2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами", сбор отходов осуществляется в одноразовые пакеты желтого цвета, предназначенные для утилизации медицинских отходов класса Б (ГОСТ Р 50962-96).

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение ДНК из биопробы

- для выделения ДНК из фекальных образцов и ректальных мазков рекомендуется к применению набор ДНК-ЭКСПРЕСС производства НПО «Литех» или аналоги, предназначенные для выделения ДНК из кала;
- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 3000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Термит, поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

2-й этап - проведение ПЦР-амплификации

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) 0,5 – 10; 20-200 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;
- термостат программируемый (амплификатор) для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени»;
- бесцветные одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,2 мл для амплификации (для комплектации набора – «нераскапанный»).

3-й этап - детекция продуктов амплификации:

- термостат программируемый (амплификатор) для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени»

7. ПРОБОПОДГОТОВКА

7.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Для исследования можно использовать следующий биологический материал:

- кал (для обнаружения ДНК *Lamblia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*);
- ректальный мазок.

Материал доставляют в лабораторию в течение суток, хранить образцы при температуре 2-8 °С .

7.2. Предварительная обработка клинического материала не требуется.

7.3. Выделение ДНК из фекальных образцов и ректальных мазков

ДНК желательно выделять из жидкого материала. Если образец твердый (кал), небольшое количество материала (не более 100 мг) ресуспендировать в транспортной среде или физиологическом растворе. Также возможно выделение ДНК из твердого материала. В этом случае небольшое количество образца можно перенести прямо в пробирку на кончике наконечника дозатора (примерное количество вносимого образца показано на рисунке).

Внимание: использование избытка материала для выделения может привести к ингибированию ПЦР.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Подготовка ПЦР (раскапанный вариант)

1. В штатив поставить необходимое количество стрипов с амплификационными смесями из расчета – 1 стрип на 2 пробы плюс один стрип для положительного и отрицательного контролей, а также необходимое количество стрипов для амплификационной смеси «ВК» (при расчете необходимо учитывать пробирки для положительного и отрицательного контролей). Расположение смесей в стрипе для набора «Прото-скрин» см. в таблице 1.
2. В каждую пробирку внести по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Таq-полимеразы (не повреждая слой воска), закрыть пробирки.

Таблица 1. Порядок расположения смесей для амплификации в стрипах набора «Прото-скрин»

№ пробирки	Название смеси	Внешний вид
1	ПЦР-смесь «Lamb»	Окрашенная жидкость
2	ПЦР-смесь «Bh»	Прозрачная бесцветная жидкость
3	ПЦР-смесь «AmFr/IsoB»	Прозрачная бесцветная жидкость
4	ПЦР-смесь «Cp/EnHi»	Прозрачная бесцветная жидкость
5	ПЦР-смесь «Lamb»	Окрашенная жидкость
6	ПЦР-смесь «Bh»	Прозрачная бесцветная жидкость
7	ПЦР-смесь «AmFr/IsoB»	Прозрачная или светло-розовая жидкость
8	ПЦР-смесь «Cp/EnHi»	Прозрачная или светло-розовая жидкость

8.2. Подготовка ПЦР (нераскапанный вариант)

1. В штатив поставить необходимое количество пробирок в соответствии с количеством проб, и две пробирки для положительного и отрицательного контролей для амплификационной смеси каждой специфичности (ПЦР-смесь «Lamb», ПЦР-смесь «Bh», ПЦР-смесь «AmFr/IsoB», ПЦР-смесь «Cp/EnHi», ПЦР-смесь «ВК»).
2. В каждую пробирку внести по 10 мкл соответствующей амплификационной смеси
3. В каждую пробирку внести по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Таq-полимеразы.

8.3. Постановка ПЦР (аналогично для раскапанного и нераскапанного вариантов)

1. В подготовленные пробирки внести по 5 мкл анализируемых проб.

2. В контрольные пробирки внести по 5 мкл положительных контрольных образцов соответствующей специфичности или 5 мкл ОКО. Установить все пробирки в блок детектирующего амплификатора.
3. Запустить программу амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 3.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Таблица 3. Программа амплификации

Температура	Время	Количество циклов
94°C	5 мин	1
94°C	5 сек	45
58°C	6 сек	
72°C	10 сек	
10°C - хранение		

8.4. Регистрация результатов

Детекция продуктов амплификации. Для анализа результатов тестов необходимо использовать:

- канал FAM для обнаружения ДНК *Lamblia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Cryptosporidium parvum*, а также бактериальной ДНК (используется в качестве внутреннего контроля качества выделения ДНК из фекальных образцов);
- канал HEX для обнаружения ДНК *Isospora belli*, *Entamoeba histolytica*.

Флуоресцентная детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием детектирующего амплификатора. Учет результатов следует начинать с результатов амплификации положительных и отрицательных контрольных образцов и внутреннего контроля.

9. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции на канале FAM/HEX с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла *Ct*.

Принцип интерпретации:

Результаты анализа не учитываются, если:

- Во время прохождения реакции детектирующий амплификатор не регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции в пробирке с положительными контрольными образцами; в данной ситуации необходимо повторное исследование всех образцов.
- В пробирках с ВК не регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции или значение порогового цикла *Ct* превышает допустимое значение, указанное в паспорте набора; в этой ситуации необходим повторный анализ всех образцов, включающий стадию выделения ДНК.
- В пробирке с ОКО регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции. Необходимо принятие мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов.

- Во время прохождения амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции в пробирке с положительными контрольными образцами и значение пороговых циклов C_t для каждого из образцов не превышает допустимых значений, указанных в паспорте набора;

- Во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал в пробирке с отрицательным контрольным образцом или не превышает допустимого значения, указанного в паспорте набора;

- Во время прохождения амплификации регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции в пробирке с внутренними контрольными образцами и значение порогового цикла C_t для каждого из образцов не превышает допустимого значения, указанного в паспорте набора.

- Образец **положителен** на наличие ДНК простейших (*Lambia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*), если для данной пробы определено значение порогового цикла, причем кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке экспоненциального роста флуоресценции.

- Образец **отрицателен** на наличие ДНК простейших (*Lambia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*), если для данной пробы отсутствует (не определяется) значение порогового цикла (кривая флуоресценции данной пробы не пересекает пороговую линию).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Для транспортировки, хранения и работы с наборами реагентов необходимо соблюдать температурный режим (2-8) °С.

Набор реагентов пригоден для применения в течение 6 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО «АльфаЛаб», Санкт Петербург, ул. Академика Павлова, 14а, тел/факс 8(812)385-00-55

Разработчик Людино В.И.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической

лабораторной диагностики

ГБОУ ДПО РМАПО

Минздрава России Долгов В.В.



примено и
использовано в
целях
Технической

