УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От_____200 г. № _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО НПФ «Литех»

_____С.Прозоровский

«__» _____2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для обнаружения ДНК
Бактероидов (Bacteroides spp.)
методом полимеразной цепной реакции

БАКТОПОЛ

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «БАКТОПОЛ» предназначен для качественного обнаружения ДНК Бактероидов (Bacteroides spp.) в биологическом материале человека (мазки из влагалища) методом полимеразной цепной реакции.

Набор предназначен для применения только in vitro.

1.2. Набор реагентов «БАКТОПОЛ» может быть использован в клинической диагностике условно-патогенных микроорганизмов семейства Бактероидов (Bacteroides spp.) для выявления нарушений нормальной микрофлоры влагалища и оценки эффективности лечения бактериальных вагинозов.

1.3. Набор имеет форматы: Базовый и Флуоропол, различающиеся комплектацией (числом реакционных доз - постановочных реакций, степенью готовности компонентов к постановке амплификации) и способом детекции амплифицированного фрагмента ДНК (электрофоретическое разделение продуктов в агарозном геле или флуоресцентная детекция на адаптированных для этого приборах).

Формат Базовый. Набор рассчитан на проведение анализа 50, или 100, или 200 клинических образцов, 5, или 10, или 20 проб положительного контрольного образца ДНК Бактероидов и 5, или 10, или 20 проб отрицательного контрольного образца (всего 60, или 120, или 240 определений) и последующей детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом электрофореза в агарозном геле.

Формат Флуоропол. Набор рассчитан на проведение анализа 100 клинических образцов, 10 проб положительного контрольного образца ДНК , 10 проб отрицательного контрольного образца, 10 проб фоновых образцов (всего130 определений) и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «по конечной

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

точке» реакции или «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

2.1. Набор реагентов «БАКТОПОЛ» основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК Бактероидов путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 3 этапа:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК).

2. Постановка реакции ПЦР-амплификации.

3.Детекция продуктов амплификации. Осуществляется двумя способами в зависимости от формата набора:

- методом электрофореза в агарозном геле (формат Базовый);

- методом флуоресцентной детекции (формат Флуоропол), который позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации ДНК-фрагмента в процессе реакции. Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе за счет специфической гибридизации ампликонов с олигонуклеотидным зондом, несущим флуоресцентную метку. В ходе последующей полимеразной реакции происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе. Программное обеспечение, прилагаемое к амплификатору или флуоресцентному детектору, позволяет проводить корректную обработку данных для выявления ДНК Бактероидов.

Флуоресцентная детекция не требует открывания пробирок после проведения ПЦР и извлечения из них продуктов реакции, что значительно снижает опасность контаминации помещения и реагентов ампликонами.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

100% специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам последовательности гена 16S РНК, консервативного внутри семейства Бактероидов (Bacteroides spp.), а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарным участком ампликона (специфического продукта амплификации). Использование набора «БАКТОПОЛ» позволяет выявлять только представителей семейства Бактероидов и исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

3.2. Чувствительность анализа

С помощью набора «БАКТОПОЛ» можно обнаружить 10^4 геном-эквивалентов/мл и более ДНК-матриц Бактероидов в пробе, прощедшей обработку (выделение ДНК).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск примепения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4.4. При работе с анализируемым биоматериалом следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. биологический материал человека может являться источником инфекционных или вирусных заболеваний.

5. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора реагентов входят три комплекта:

5.1. Комплект для пробоподготовки (выделение ДНК):

Реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб с целью последующего анализа методом полимеразной цепной реакции («ДНК-ЭКСПРЕСС») (на 100 анализируемых проб).

Комплект «ДНК-ЭКСПРЕСС» состоит из 100 пробирок типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой, содержащих по 200 мкл реагента.

5.2. Комплект реагентов для проведения ПЦР-амплификации.

Данные комплекты выпускаются в различных форматах, в зависимости от числа реакционных доз (постановочных реакций), степени их готовности к постановке амплификации (см табл. 1) .

Таблица 1

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
Формат Базовый Маркировка (50)	1. Реакционная смесь*..... 2. Taq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5.Положительный контрольный образец ДНК...	1 пробирка – 165 мкл 1 пробирка – 31 мкл 1 пробирка – 2 мл 1 пробирка – 2,2 мл 1 пробирка – 60 мкл
Формат Базовый Маркировка (100)	1. Реакционная смесь*..... 2. Taq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК....	1 пробирка – 310 мкл 1 пробирка – 31 мкл 1 пробирка – 2 мл 1 пробирка – 2,2 мл 1 пробирка – 60 мкл
Формат Базовый Маркировка (200)	1. Реакционная смесь*..... 2.Taq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК....	1 пробирка – 620 мкл 1 пробирка – 55 мкл 2 пробирки – по 2 мл 2 пробирки – по 2,2 мл 1 пробирка – 100 мкл
Формат Флуоропол Маркировка КТ (по конечной точке)	1. Реакционная смесь** 2. Taq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК.... 6. Реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС»	1 пробирка – 680 мкл 1 пробирка – 30 мкл 1 пробирка – 2 мл 2 пробирки – по 2 мл 1 пробирка – 100 мкл 1 пробирка – 200 мкл
Формат Флуоропол Маркировка РВ (в реальном времени)	1. Реакционная смесь** 2. Taq-полимераза..... 3. Разбавитель..... 4. Минеральное масло..... 5. Положительный контрольный образец ДНК.... 6. Реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС»	1 пробирка – 1360 мкл 1 пробирка – 60 мкл 2 пробирки – по 2 мл 2 пробирки – по 2 мл 1 пробирка – 200 мкл 1 пробирка – 200 мкл

Комплекты для проведения амплификации включают готовые к применению реагенты.

*В состав реакционной смеси (формат Базовый) входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров;

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

- ПЦР-буфер;
- внутренний контроль (рекомбинантная плазмида, содержащая фрагмент-вставку определенного размера);

**В состав реакционной смеси (формат Флуоропол) входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфичных праймеров;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды (2 зонда): зонд для специфического фрагмента содержит флуорофор FAM, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX;
- праймеры для выявления внутреннего контроля (геномная ДНК); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения ДНК.

Комплект для проведения амплификации (по желанию клиента) может также представлять готовую к применению расфасованную по индивидуальным пробиркам амплификационную смесь.

5.3. Комплект реагентов для электрофоретической детекции.

Таблица 2

Формат Маркировка	Состав	Комплектация
Комплект №1	1.Агароза 2. Раствор бромистого этидия 3. 50-кратный ТАЕ-буфер	1 флакон – 4,0 г 1 пробирка – 30 мкл 2 флакона - по 13 мл
Комплект №2	1. 2% агарозный гель (40 лунок) 2. 50-кратный ТАЕ-буфер	3 планшета 1 флакон – 25 мл

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение ДНК из биопробы

Для всех форматов

- реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб «ДНК-ЭКСПРЕСС»
- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 8000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до + 99°С;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- стерильные центрифужные пробирки вместимостью 15 мл;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

2-й этап - проведение ПЦР-амплификации

2.1. Для всех форматов

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор);
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

2.2. Для формата Флуоропол

- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени»;
- **бесцветные** одноразовые полипропиленовые микропробирки вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) для амплификации.

3-й этап - детекция продуктов амплификации.

3.1. Методом электрофореза в агарозном геле для формата Базовый.

- комплект реагентов для электрофоретической детекции (комплект № 1 или комплект № 2)
- камера для горизонтального электрофореза;
- источник постоянного тока с напряжением не менее 150 В;
- УФ-трансиллюминатор;
- СВЧ-печь для плавления агарозы;
- весы технические;
- вода дистиллированная;
- видеосистема для документирования гель-электрофореграмм со светозащитным кабинетом или тубусом, подключенная к персональному компьютеру;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- емкость пластиковая большого объема для дезактивации буфера и гелей.

3.2. Методом флуоресцентной детекции для формата Флуоропол «по конечной точке»

- флуоресцентный детектор.

7. ПРОБОПОДГОТОВКА

7.1. Взятие, доставка и хранение клинического материала.

Образцы **мазков** помещают непосредственно в пробирки с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС»: исследуемый материал, полученный с помощью одноразовых стерильных зондов, перенести в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, содержащую 200 мкл реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС», перемешать, зонд извлечь и утилизировать, пробирку плотно закрыть.

Полученные образцы использовать в течение 2 часов для выделения ДНК. Допускается хранение проб в реагенте «ДНК-ЭКСПРЕСС» при температуре +2-8^{o}С не более 1 суток или при температуре -18...-20^{o}С не более 2 недель.

7.2. Предварительная обработка клинического материала

Образцы **мазков** в пробирке с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС» не требуют предварительной обработки.

7.3. Выделение ДНК.

7.3.1. Пробирку с реагентом “ДНК-ЭКСПРЕСС”, содержащую анализируемый материал, тщательно перемешать на микроцентрифуге- вортексе в течение 10 секунд.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.3.2. Пробирку с перемешанным содержимым поместить в твердотельный термостат предварительно прогретый до температуры + 98°С, и прогреть при температуре + 98°С в течение 10 минут.

Примечание: перед помещением пробирок в термостат необходимо проверить, чтобы во всех пробирках был защелкнут замочек на крышках. Для эффективной пробоподготовки необходимо убедиться, что твердотельный термостат поддерживает температуру процесса не менее + 98°С.

7.3.3. После прогрева пробирки перенести в центрифугу и центрифугировать при 12000-16000 g (8000 - 12000 об/мин) при комнатной температуре в течение 15 секунд.

7.3.4. Полученный в результате центрифугирования супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки амплификации.

Полученные пробы можно хранить при температуре +2- 8°С не более одной недели или при температуре -18...-20°С не более 6 месяцев.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Проведение ПЦР-амплификации с использованием комплекта реагентов формата Базовый.

8.1.1. Приготовить и пронумеровать пробирки вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца.

8.1.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

8.1.3. Приготовить амплификационную смесь (формат Базовый) согласно приведенной таблице (табл. 3):

Таблица 3

Кол-во пробирок	Разбавитель, мкл	Реакционная смесь, мкл	Taq-полимераза, мкл
1	17,5	2,5	0,2
5	87,5	12,5	1
10	175	25	2
15	263	37,5	3
20	350	50	4
25	438	62,5	5

ВНИМАНИЕ! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками!

8.1.4. После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.

8.1.5. Внести по 20 мкл амплификационной смеси во все пробирки, подготовленные для амплификации.

8.1.6. Добавить во все пробирки по 20 мкл минерального масла.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8.1.7. Внести 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. 7.3.4) в соответствующую пробирку с амплификационной смесью под слой масла, используя индивидуальные наконечники с фильтрами.

8.1.8. Внести в пробирку для положительного контрольного образца ДНК 5 мкл положительного контрольного образца ДНК Бактероидов, а в пробирку для отрицательного контрольного образца – 5 мкл разбавителя.

8.1.9. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°С) на микроцентрифуге-вортексе.

8.1.10. Перенести пробирки в прогретый до температуры +93° С программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе:

+93°С – 30 секунд

+93°С – 10 секунд +60°С – 10 секунд +72°С – 10 секунд	количество циклов 35

+72°С – 1 минута

Примечание. Приведенная программа отработана для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик», имеющем режим активного регулирования. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов «БАКТОПОЛ».

8.2. Проведение ПЦР-амплификации с использованием комплекта реагентов формата Флуоропол.

8.2.1. Приготовить и, по возможности, пронумеровать **бесцветные** пробирки, соответствующие типу прибора (согласно инструкции к прибору).

8.2.2. За 20-30 минут до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

8.2.3. Приготовить рабочую смесь, смешав нужные количества разбавителя и реакционной смеси в соотношении 3:1 (табл. 4), и тщательно перемешать пипетированием, если объем меньше 200 мкл, или на микроцентрифуге-вортексе.

Таблица 4

Разбавитель, мкл	Реакционная смесь, мкл	Объем рабочей смеси, мкл
15	5	20
30	10	40
60	20	80
300	100	400
600	200	800
900	300	1200
1200	400	1600

8.2.4. Если требуется приготовление фоновых пробирок, в каждую из них необходимо внести необходимый объем (согласно инструкции к прибору) рабочей смеси .

8.2.5. Для приготовления амплификационной смеси в оставшуюся рабочую смесь добавить Taq-полимеразу. Вносимый объем должен составлять 1/100 от объема имеющейся рабочей смеси. Смесь тщательно перемешать пипетированием или на микроцентрифуге-вортексе (табл. 5).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 5

Объем рабочей смеси, мкл	Taq-полимераза
20	0,2
40	0,4
80	0,8
400	4
800	8
1200	12
1600	16

8.2.6. Внести в приготовленные пробирки, кроме фоновых, указанный в инструкции к прибору объем амплификационной смеси (табл. 6).

Таблица 6

Объем амплификационной смеси на образец, мкл	Объем образцов, мкл			Примеры приборов
	Исследуемый	Отрицательный контрольный образец	Положительный контрольный образец ДНК	
20	5	5	5	Терцик/Джин (*ДНК-технология*)
40	10	10	10	MiniOpticon, IQ5 (*BioRad*)
80	20	20	20	Cobas Taqman 48 (*Roche*)

8.2.7. При необходимости (согласно инструкции к прибору) добавить во все пробирки указанное количество минерального масла.

8.2.8. Добавить во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами в объеме 1/4 от внесенной амплификационной смеси:

а) в фоновые пробирки – реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС» (входит в состав набора);

б) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

в) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

г) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует по возможности немедленно закрывать крышкой.

8.2.9. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 2250 – 4000 g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°С) на микро-центрифуге-вортексе.

8.2.10. В случае проведения ПЦР с детекцией результата «по конечной точке» реакции перенести пробирки в прогретый до температуры +94°С программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе:

+94 °С	1 минута 30 секунд	
+94 °С	10 секунд	40 циклов
+64 °С	10 секунд	
+72 °С	40 секунд	
+72 °С	2 минуты	
+10 °С	Хранение	

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Примечание. Приведенные программы отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик», имеющем режим активного регулирования. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов «БАКТОПОЛ».

8.2.11. При проведении ПЦР с детекцией результата «в реальном времени» амплификацию следует проводить по следующей программе:

+94 °С	1 минута 30 секунд	
+94 °С	10 секунд	40 циклов
+64 °С	10 секунд	
+72 °С	40 секунд	
+50 °С	считывание	

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора.

8.3. Детекция продуктов амплификации (для формата Базовый).

8.3.1. Проведение электрофореза

8.3.1.1. Заполнить камеру для электрофореза 1хТАЕ буфером, приготовленным на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ буфера в 50 раз.

Примечание. При использовании «Комплекта для электрофоретической детекции № 2» проведение электрофореза начинать с п. 8.3.1.5.

8.3.1.2. К 2 г агарозы добавить 2 мл 50хТАЕ буфера и 100 мл дистиллированной воды.

8.3.1.3. Расплавить агарозу на электрической плитке, или на водяной бане, или в СВЧ-печи. Добавить к 100 мл раствора агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия, перемешать.

8.3.1.4. Охладить агарозу до температуры +50-60°С при комнатной температуре (+18-25°С) и залить в планшет для заливки гелей. Для получения карманов в агарозном геле установить гребенку на планшет, используя зажим типа "бульдог". После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза.

8.3.1.5. Нанести в карманы геля по 10 мкл продукта амплификации в последовательности, соответствующей нумерации проб.

8.3.1.6. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/см длины геля. Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за электрофоретическим разделением осуществлять визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта не менее 1,5-2 см.

8.3.2. Регистрация результатов электрофореза

8.3.2.1. Вынуть гель из планшета и перенести гель на стекло ультрафиолетового трансиллюминатора.

ВНИМАНИЕ! С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном.

8.3.2.2. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся полос оранжево-красного цвета.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ВНИМАНИЕ! Просмотр геля следует проводить только через защитный экран или защитные очки, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги и вреден для глаз.

8.3.2.3. Полученные результаты можно документировать фотографированием гелей с использованием оранжевого или интерференционного (594 нм) светофильтра.

8.4. Детекция продуктов амплификации (для формата Флуоропол).

8.4.1. Детекция продуктов амплификации для формата Флуоропол «по конечной точке».

При проведении ПЦР с детекцией результатов «по конечной точке» реакции следует, по окончании реакции, перенести пробирки из амплификатора в прибор для флуоресцентной детекции результатов реакции (ПЦР-детектор) и провести измерения согласно инструкции к прибору. Анализ проводится управляющей программой ПЦР-детектора автоматически на основании указываемых оператором пороговых значений.

Для ПЦР-детектора «ДЖИН» установлены следующие пороговые значения:

Возбудитель	-	+	ВК
Bacteroides spp.	2,00	2,25	2,25

Примечание. Приведенные характеристики и пороговые значения отработаны для постановки реакции на амплификаторе модели «Терцик» и ПЦР-детекторе «ДЖИН». По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов «БАКТОПОЛ».

8.4.2. Детекция продуктов амплификации для формата Флуоропол « в реальном времени».

При проведении ПЦР с детекцией результатов в режиме «реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции прибор выдает кривые накопления флуоресцентного сигнала.

9. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов для форматов Базовый.

9.1.1. В отрицательном контрольном образце должна выявляться только одна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю, размером 600 п.н. Появление второй полосы на уровне положительного контрольного образца ДНК свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.

В положительном контрольном образце ДНК должны выявляться две полосы:

1) полоса оранжево-красного цвета размером 434 п.н., соответствующая положительному контрольному образцу ДНК Бактероидов;

2) полоса оранжево-красного цвета размером 600 п.н., соответствующая внутреннему контролю.

Анализируемые пробы.

Отсутствие полосы оранжево-красного цвета строго на уровне положительного контрольного образца ДНК (434 п.н.) свидетельствует об отсутствии ДНК Бактероидов в анализируемой пробе.

Наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контрольному образцу ДНК (434 п.н.), свидетельствует о присутствии ДНК Бактероидов в анализируемой пробе.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Во всех отрицательных образцах должна выявляться полоса оранжево-красного цвета размером 600 п.н., соответствующая внутреннему контролю

Примечание. Если в пробе присутствует большое количество ДНК искомого возбудителя, то на гель-электрофореграмме должна наблюдаться интенсивная полоса на уровне положительного контрольного образца ДНК, но при этом может не наблюдаться полосы внутреннего контроля; такие пробы следует интерпретировать как положительные.

Если в анализируемом образце отсутствует как полоса, соответствующая по подвижности положительному контрольному образцу ДНК, так и полоса внутреннего контроля, это означает, что реакция амплификации не прошла (возможные причины: проба содержит вещества, ингибирующие ПЦР; неадекватная работа амплификатора; ошибка выполнения процедуры проведения анализа и др.). В этом случае необходимо провести повторный анализ, начиная со стадии выделения ДНК.

9.2. Анализ и интерпретация результатов для формата Флуоропол.

9.2.1. При проведении детекции «по конечной точке» реакции анализ проводится управляющей программой автоматически на основании указываемых оператором пороговых значений. Результат выводится в соответствующем месте протокола, зависящем от конкретной программы.

Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7

	Результат	**Специфика***	**ВК***	**Итерпретация**
К+	+	Сигнал>«+»	любой	Реакция прошла
	-	Сигнал<«-»	Сигнал>«**ВК**»	Реакция не прошла. НЕОБХОДИМА перестановка
	нд (па, N/A)	Сигнал<«-»	Сигнал<«**ВК**»	
	?	«-»<Сигнал <«+»	любой	
К-	**нд (па, N/A)**	Сигнал<«-»	Сигнал<«**ВК**»	Контаминация отсутствует
	-	Сигнал<«-»	Сигнал>«**ВК**»	Контаминация геномной ДНК человека. Перестановка НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
	+	Сигнал>«+»	любой	Специфическая контаминация. НЕОБХОДИМА перестановка.
	?	«-»<Сигнал <«+»	любой	
Анализируемый образец	+	Сигнал>«+»	любой	Положительная проба
	-	Сигнал<«-»	Сигнал>«**ВК**»	Отрицательная проба
	?	«-»<Сигнал <«+»	любой	Сомнительный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
	нд (па, N/A)	Сигнал<«-»	Сигнал<«**ВК**»	Недостоверный результат. НЕОБХОДИМ повтор анализа.
фон	**фон**	Не интерпретируется.		

** Сигнал соответствующего канала сравнивается со следующими пороговыми значениями:*
- для специфического сигнала(Специфика) – положительным «+» и отрицательным «-» пороговыми значениями;
- для внутреннего контроля – с пороговым значением внутреннего контроля **«ВК»**.

В столбце *Результат* выводится качественный результат анализа, определенный на основе сравнения полученных после нормировки значений сигнала с пороговыми.

В столбцах *Специфика* и *ВК* выводятся численные значения сигнала в соответствующих каналах, нормированные на фон (усредненный фон принимается равным 1, нормировочные

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

коэффициенты для каждого канала выводятся под соответствующим столбцом). Те же значения в графическом виде представлены на диаграмме.

Примечание. При возникновении сомнительных или недостоверных результатов, а также сообщений о недопустимом расхождении значений фоновых пробирок следует проверить порядок расстановки пробирок в детекторе, а также сами пробирки на присутствие мешающих детекции факторов и при их отсутствии еще 2 раза повторить детекцию. Корректным считать результат, зарегистрированный не менее чем в 2 измерениях из 3.

9.2.2. При проведении ПЦР с детекцией результатов «в реальном времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции следует экспортировать данные, полученные управляющей программой, и далее анализировать их в программе, предназначенной для анализа результатов.

Пороговая линия для отсечки шума и анализа выбирается согласно таблице 8.

Таблица 8

	Канал	**Флуорофор**	**Пороговая линия**	**Конечный цикл**
Внутренний контроль	F2	HEX	2	35
Bakteroides spp.	F1	FAM	1	35

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления фонового сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца означает, что пересечения кривой накопления фонового сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла. Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

9.2.3. Интерпретация результатов анализа проводится в соответствии с таблицей 9.

Таблица 9.

	Ct FAM	**Ct HEX**	**Результат**
К+	< КЦ	любой	Специфическая реакция прошла
К-	**НЗ** или > КЦ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	< КЦ	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или > КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
Анализируемый образец	< КЦ	любой	ПРИСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	НЗ или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	НЗ или > КЦ	**НЗ** или > КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.
Фон	НЕ ИНТЕРПРЕТИРУЕТСЯ		

В таблице использованы следующие обозначения:

Ct FAM – цикл пересечения кривой накопления специфического (флуорофор FAM) флуоресцентного сигнала образца с пороговой линией;

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Ct HEX – цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала внутреннего контроля образца (флуорофор HEX) с пороговой линией;

НЗ – пересечение кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не зарегистрировано;

КЦ – конечный цикл – пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией после него полностью аналогично ситуации, когда пересечение не зарегистрировано вовсе.

Примечание. Приведенные характеристики КЦ и пороговые значения представлены на примере прибора Cobas Taqman 48. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов «БАКТОПОЛ».

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8°С в течение всего срока годности. Допускается хранение реагента при температуре до +25°С не более 5 суток.

10.2. Комплекты для проведения амплификации всех форматов должны храниться при температуре минус 18-20°С в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре не выше 0^0С не более 1 суток.

10.3. Комплект для электрофоретической детекции № 1 должен храниться при комнатной температуре (+18-25^0С) в течение всего срока годности, комплект № 2 - при температуре +2-8°С в течение всего срока годности.

10.4. Срок годности набора– 6 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

10.5. Обработанные (прошедшие выделение ДНК) пробы можно хранить при температуре +2 -8°С не более одной недели или при температуре -18 -20°С не более 6 месяцев.

10.6. 1хТАЕ буфер можно хранить при комнатной температуре не более 1 недели.

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

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (499)246-45-01, или e-mail: info@lytech.ru
и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14 а, тел: (495)120-60-95; 120-60-96.

Директор ООО НПФ «Литех» Прозоровский Н.С.

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГОУ ДПО РМАПО Росздрава Долгов В.В.

Подпись Долгова В.В. удостоверяю
кадровой работы ГОУ ДПО РМАПО Росздрава
подпись 21.10.08г.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU