

**РУКОВОДСТВО
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ
для обнаружения специфических участков
ДНК возбудителей инфекций
методом ПЦР
с флуоресцентной детекцией результата
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (Real Time)**

Формат ФЛУОРОПОЛ-РВ

ОГЛАВЛЕНИЕ

РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ФОРМАТА «ФЛУОРОПОЛ–РВ»

Назначение	
Принцип метода	4
Аналитические характеристики	5
Меры предосторожности	6
Состав набора	6
Оборудование, реагенты и материалы	8
Пробоподготовка	8
Проведение анализа	11
Условия хранения и эксплуатации набора	15

ПРИЛОЖЕНИЕ

РУКОВОДСТВО ПО ПРИМЕНЕНИЮ на приборе «Cobas TaqMan48» (Roche)	
Общие сведения	16
Перед началом работы	16
Создание рабочего протокола	18
Постановка реакции амплификации	19
Детекция продуктов амплификации	21
Анализ и интерпретация результатов	21

РУКОВОДСТВО

по применению наборов реагентов для обнаружения ДНК возбудителей бактериальных и вирусных инфекций методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в «реальном времени»

ВНИМАНИЕ!

В комплектах реагентов для амплификации, выпускаемых НПФ «Литех», используется система внутреннего контроля, в которой матрицей является геномная ДНК человека, поступающая в составе пробы. Данный подход позволяет контролировать не только **ингибирование** и **адекватность постановки** реакции, но и другие параметры:

- ✓ корректность забора клинической пробы;
- ✓ эффективность пробоподготовки;
- ✓ ошибки в проведении анализа (в т.ч. не внесение образца в амплификационную смесь);
- ✓ контаминацию на ранних стадиях (до стадии, обуславливающей необходимость повтора анализа).

	Ct FAM*	Ct HEX*	Результат
K+	≤ КЦ	любой	Специфическая реакция прошла
	НЗ или > КЦ	любой	Специфическая реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки
K-	НЗ или > КЦ	любой	Контаминация отсутствует
	НЗ или > КЦ	≤ КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ, но рекомендуется проведение антиконтаминационных мероприятий.
	≤ КЦ	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки
Искусственный образец (плазма, культура клеток, стандартный образец, и т.д.)	≤ КЦ	любой	ПРИСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	НЗ или > КЦ	любой	ОТСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
Клинический 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.

* Цикл пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала (Ct) от соответствующего канала сравнивается с приводимыми в таблицах значениями конечных циклов (КЦ). **НЗ** (нет значения) обозначает отсутствие пересечения.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. НПФ «Литех» выпускает наборы реагентов для выявления ДНК возбудителей инфекций методом ПЦР с детекцией результата в режиме «реального времени». Набор состоит из двух комплектов:

1. Комплект для выделения ДНК («ДНК-экспресс»)

2. Комплект для амплификации и последующей флуоресцентной детекции результата в режиме реального времени - формат «Флуоропол-РВ»

Наборы реагентов формата ФЛУОРОПОЛ предназначены для качественного обнаружения ДНК возбудителей бактериальных и вирусных инфекций в биологических пробах (соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала, уретры, конъюнктивы глаз, задней стенки глотки; осадок мочи, сперма, отделяемое простаты, ликвор, синовиальная жидкость, смывы из бронхов, мокрота, лейкоцитарная масса крови) методом полимеразной цепной реакции.

1.2. Наборы реагентов ФЛУОРОПОЛ могут быть использованы в клинической диагностике носительства урогенитальных инфекций, а также для оценки эффективности терапии.

1.3. Наборы предназначены только для применения *in vitro*. Набор имеет 2 варианта комплектации, предназначенных для амплификации и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами: «Нераскапанный» (состоит из 5 компонентов, требующих смешения при подготовке к проведению ПЦР) и «One Step» (раскапанный в амплификационные пробирки; полностью готовые смеси под слоем масла).

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

2.1. Принцип действия наборов реагентов формата ФЛУОРОПОЛ основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК указанных возбудителей 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, с использованием флуориметрии в режиме реального времени или по окончании реакции – анализ «по конечной точке».

Метод флуоресцентной детекции в режиме реального времени позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации фрагмента ДНК 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. По нарастанию интенсивности флуоресцентного сигнала программное обеспечение, прилагаемое к детектирующему амплификатору, позволяет проводить корректную обработку данных для выявления ДНК инфекционного возбудителя.

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

Анализ проб с использованием Набора ФЛУОРОПОЛ включает 3 этапа (в случае ПЦР с детекцией результатов реакции в режиме реального времени 2 и 3 этап происходят одновременно):

1. Обработка биологической пробы (выделение ДНК).
2. Постановка реакции ПЦР-амплификации.
3. Флуориметрическая детекция продуктов амплификации непосредственно в процессе амплификации.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

100% специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей:

бактероидов (*Bacteroides spp.*)

вируса Эпштейн-Барр (*Epstein-Barr virus*)

вирусов папилломы человека (*Human papilloma virus*) 16 и 18 типа

вирусов папилломы человека (*Human papilloma virus*) 6 и 11 типа

вирусов папилломы человека (*Human papilloma virus*) 31 и 33 типа

вирусов простого герпеса (*Herpes Simplex virus*) 1 и 2 типа

гарднерелл (*Gardnerella vaginalis*)

гонококка (*Neisseria gonorrhoeae*)

кандиды (*Candida albicans*)

лактобацилл (*Lactobacillus spp.*)

микоплазм (*Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium*)

мобилункуса (*Mobiluncus curtisii*)

токсоплазмы (*Toxoplasma gondii*)

трихомонад (*Trichomonas vaginalis*)

уреаплазм (*Ureaplasma spp., urealyticum (T-960), parvum*)

хламидий (*Chlamydia trachomatis, Chlamydia pneumonia*)

цитомегаловируса (*Cytomegalovirus*)

кишечной палочки (*Escherichia coli*)

протеев (*Proteus spp.*)

синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*)

энтерококков (*Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium*)

энтеробактерий (*Enterobacter spp., Klebsiella spp.*)

серраций (*Serratia spp.*)

стафилококков (*Staphylococcus aureus*)

стрептококков (*Streptococcus spp., Streptococcus pyogenes*)

атопобиума (*Atopobium vaginae*)

дифтерий (*Corynebacterium diphtheriae*)

листерий (*Listeria spp.*)

микобактерий (*Mycobacterium tuberculosis, bovis*)

резистентность *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином

резистентность *Staphylococcus aureus* к цефалоспорином

а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарным участком ампликона (специфического продукта амплификации).

3.2. Чувствительность анализа для некоторых патогенов составляет:

бактероидов (*Bacteroides spp.*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл

вируса папилломы человека (*Human papilloma virus*) 16 и 18 типа – $1,6 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл

вирусов папилломы человека (*Human papilloma virus*) 6 и 11 типа – 10^4 геном-эквивалентов/мл

вирусов папилломы человека (*Human papilloma virus*) 31 и 33 типа – 10^4 геном-эквивалентов/мл

вируса простого герпеса (*Herpes Simplex virus*) 1 и 2 типа – $2 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл

вируса Эпштейн-Барр (*Epstein-Barr virus*) – $3 \cdot 10^4$ геном-эквивалентов/мл

гарднерелл (*Gardnerella vaginalis*) – 10^6 геном-эквивалентов/мл

гонококка (*Neisseria gonorrhoeae*) – $5 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл

кандиды (*Candida albicans*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл

лактобацилл (*Lactobacillus spp.*) – 10^6 геном-эквивалентов/мл

микоплазм (*Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл

мобилункуса (*Mobiluncus curtisii*) – 10^4 геном-эквивалентов/мл

токсоплазмы (*Toxoplasma gondii*) – 10^3 геном-эквивалентов/мл

трихомонад (*Trichomonas vaginalis*) – 10^3 геном-эквивалентов/мл

уреаплазм (*Ureaplasma spp.*, *urealyticum* (T-960), *Parvum*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
хламидий (*Chlamydia trachomatis*) – 10³ геном-эквивалентов/мл
цитомегаловируса (*Cytomegalovirus*) – 2·10⁴ геном-эквивалентов/мл
кишечной палочки (*Escherichia coli*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
протеев (*Proteus spp.*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
энтерококков (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
энтеробактерий (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
сerratий (*Serratia spp.*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
стафилококков (*Staphylococcus aureus*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
стрептококков (*Streptococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
атопобииума (*Atopobium vaginae*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
хламидий (*Chlamydia pneumonia*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
дифтерий (*Corynebacterium diphtheriae*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
листерий (*Listeria spp.*) – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
микобактерий (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*) – 5·10³ геном-эквивалентов/мл
резистентность *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином – 10⁴ геном-эквивалентов/мл
резистентность *Staphylococcus aureus* к цефалоспорином – 10⁴ геном-эквивалентов/мл

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

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.).

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

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»-Неокрашенный).

Комплект «ДНК-ЭКСПРЕСС-неокрашенный» состоит из пробирок типа Эппендорф объемом 1,5 мл с защелкивающейся крышкой, содержащих по 300 мкл реагента.

Комплект на 100 определений 100 пробирок (по 300 мкл реагента)

5.2. Комплекты реагентов для проведения ПЦР-амплификации формата Флуоропол:

- 1) БАКТОПОЛ (*Bacteroides spp.*)
- 2) ВИПАПОЛ 16 (*Human papilloma virus 16*)
- 3) ВИПАПОЛ 16/18 (*Human papilloma virus 16,18*) без дифференциации типа
- 4) ВИПАПОЛ 16/18 (*Human papilloma virus 16,18*) с дифференциацией типа*
- 5) ВИПАПОЛ 18 (*Human papilloma virus 18*)
- 6) ВИПАПОЛ 6/11 (*Human papilloma virus 6,11*) без дифференциации типа
- 7) ВИПАПОЛ 6/11 (*Human papilloma virus 6,11*) с дифференциацией типа*
- 8) ВИПАПОЛ 31/33 (*Human papilloma virus 31,33*) без дифференциации типа
- 9) ГАРДПОЛ (*Gardnerella vaginalis*)
- 10) ГЕРПОЛ I (*Herpes Simplex virus type 1*)
- 11) ГЕРПОЛ I + II (*Herpes Simplex virus type 1+ type 2*)
- 12) ГЕРПОЛ II (*Herpes Simplex virus type 2*)
- 13) ГОНОПОЛ (*Neisseria gonorrhoeae*)
- 14) КАНДИПОЛ (*Candida albicans*)
- 15) ЛАКТОПОЛ (*Lactobacillus spp.*)
- 16) МОБИКУРТ (*Mobiluncus curtisii*)

- 17) ПОЛИМИК-2 (*Mycoplasma genitalium*)
- 18) ПОЛИМИК-Мк (*Mycoplasma hominis*)
- 19) ПОЛИМИК-Хл (*Chlamydia trachomatis*)
- 20) ПОЛИМИК-Ур (*Ureaplasma spp.*)
- 21) УРЕАПОЛ-*parvum* (*Ureaplasma parvum*)
- 22) УРЕАПОЛ-*urealyticum* (*Ureaplasma urealyticum*)
- 23) ТОКСОПОЛ (*Toxoplasma gondii*)
- 24) ТРИПОЛ (*Trichomonas vaginalis*)
- 25) ЦИТОПОЛ (*Cytomegalovirus*)
- 26) ЭБАРПОЛ (*Epstein-Barr virus*)
- 27) Комплект для ПЦР-диагностики **БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА** (*Lactobacillus spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Bacteroides spp.*, *Mobiluncus curtisii*)
- 28) КОЛИПОЛ (*Escherichia coli*)
- 29) ПРОТЕПОЛ (*Proteus spp.*)
- 30) АРУГИПОЛ (*Pseudomonas aeruginosa*)
- 31) ЭНКОПОЛ (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*)
- 32) ЭНТЕРОПОЛ (*Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*)
- 33) СЕРАТИПОЛ (*Serratia spp.*)
- 34) СТАФИПОЛ (*Staphylococcus aureus*)
- 35) СТРЕПТОПОЛ (*Streptococcus spp.*)
- 36) СТРЕПТОПОЛ-А (*Streptococcus pyogenes*)
- 37) АТОПОЛ (*Atopobium vaginae*)
- 38) АТОПОЛ (*Atopobium vaginae*)
- 39) ПОЛИДИФ (*Corynebacterium diphtheriae*)
- 40) ПНЕВМОПОЛ-ХЛ (*Chlamydia pneumonia*)
- 41) ЛИСТЕРИОПОЛ (*Listeria spp.*)
- 42) ПОЛИТУБ (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*)
- 43) ЭНТЕРОЦЕФ (Резистентность *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином)
- 44) СТАФИЛОЦЕФ (Резистентность *Staphylococcus aureus* к цефалоспорином)

* - только для приборов с возможностью детекции по каналу Rox

Комплекты реагентов для проведения ПЦР-амплификации выпускаются отдельно для каждого вида возбудителя и отличаются только специфическими праймерами и зондом, входящими в состав реакционной смеси.

Состав набора	Количество	Формат, фирма
<ol style="list-style-type: none"> 1. Реакционная смесь 5^x концентрат* 2. Таq-полимераза 3. Разбавитель 4. Минеральное масло 5. Положительный контрольный образец ДНК 	<ol style="list-style-type: none"> 1 пробирка – 680 мкл 1 пробирка – 30 мкл 1 пробирка – 2 мл 2 пробирки – 4 мл 1 пробирка – 100 мкл 	“Нераскапанный”, для всех фирм
<ol style="list-style-type: none"> 1. Пробирки 0,2 мл с готовой реакционной смесью 2. Пробирка с положительным контролем 3. Пробирка с разбавителем 	<ol style="list-style-type: none"> 60 шт. 1 шт. - 55 мкл 1 шт. - 100 мкл 	“One Step” для всех фирм

Комплекты для проведения амплификации включают готовые к применению реагенты.

*В состав реакционной смеси входят:

- раствор дНТФ;
- раствор специфических праймеров для каждого возбудителя;
- Real-Time 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 человека); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения ДНК.

5.3. Флуоресцентная детекция:

Флуоресцентная детекция продуктов ПЦР-амплификации в режиме реального времени на адаптированных для этого приборах проводится непосредственно в процессе ПЦР-амплификации в соответствии с прилагаемой к прибору инструкцией и не требует дополнительного комплекта реагентов для детекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

1 этап – выделение ДНК из биопробы

- реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб «ДНК-ЭКСПРЕСС»-неокрашенный;
- ламинарный бокс 2 класса защиты;
- высокоскоростная центрифуга для пробирок 1,5 мл 8000–14000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс 1500–3000 об/мин (или вортекс);
- твердотельный термостат для пробирок 1,5 мл типа Эппендорф, поддерживающий температуру до 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема (5-50; 20-200; 100-1000 мкл);
- штативы для пробирок 1,5 мл «рабочее место»;
- штатив для хранения пробирок 1,5 мл;

2 этап - проведение ПЦР-амплификации

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- микроцентрифуга-вортекс 1500-3000 об/мин;
- пипетка-дозатор переменного объема 5-50 мкл для работы с биопробами;
- пипетки-дозаторы переменного объема (0,5-10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл) для приготовления рабочей смеси реагентов;
- бесцветные (возможно, оптические или с оптическими крышками) одноразовые полипропиленовые микропробирки 0,5 мл или 0,2 мл для амплификации согласно требованиям производителя прибора;
- одноразовые наконечники до 200 мкл и до 1000 мкл для приготовления рабочей смеси реагентов;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 100 или до 200 мкл для биопроб;
- штатив для пробирок 0,5 мл (или 0,2 мл) «рабочее место»;
- штативы для наконечников 200 мкл;
- одноразовые перчатки;
- ёмкость для сброса использованных наконечников;
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;

3 этап – анализ результатов ПЦР в приборах «реального времени».

7. ПРОБОПОДГОТОВКА

7.1. ВЫБОР АНАЛИЗИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Выбор клинического материала для исследования определяется наиболее вероятным местом локализации возбудителя. Наиболее адекватный материал для выявления возбудителей приведен в таблице на стр.9. Решение о выборе материала для исследования принимается врачом на основании совокупности жалоб пациента и клинических проявлений инфекции.

7.2. ВЗЯТИЕ, ДОСТАВКА и ХРАНЕНИЕ МАТЕРИАЛА

Взятие биологического материала, по возможности, должно проводиться в период обострения инфекции. За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры. Материал для исследования у женщин следует брать перед менструацией или через 1-2 дня после ее окончания. Женщины накануне обследования на ЗППП не должны проводить туалет наружных половых органов и

спринцевание. Взятие биоматериала для контроля эффективности лечения должно проводиться не ранее чем через 3-4 недели после окончания терапии.

Количество материала, забираемого для исследования, не должно быть избыточным, т.к. вместе с возбудителем в пробу попадают вещества, которые могут вызывать ингибирование ПЦР или могут способствовать деградации ДНК при хранении и транспортировке. При взятии мазков и соскобов достаточное количество материала - размером "со спичечную головку". Наиболее адекватным инструментом для взятия соскобов и мазков для ПЦР-анализа является специальный одноразовый урогенитальный зонд (щеточка), который собирает необходимое количество эпителия, не травмируя слизистую, почти не впитывает образец и хорошо отдает собранный материал в жидкую транспортную среду.

Возбудитель	Адекватный материал для выявления												
	соскоб эпителиальных клеток			мазки		сперма, секрет простаты	моча	слюна	ликвор	синовиальная жидкость	смывы из бронхов, мокрота, БАЛ, плевральная жидкость	лейкоцитарная масса крови	цельная кровь
	цервикальный канал	уретра	конъюнктив	влагалище	рогозлотка								
<i>Bacteroides spp.</i>				•							•		
<i>Candida albicans</i>	•	•		•			•				•		
<i>Chlamydia trachomatis</i>	•	•	•			•	•		•		•		
<i>Cytomegalovirus</i>	•	•	•	•			•	•	•			•	
<i>Epstein Barr virus</i>							•	•				•	
<i>Gardnerella vaginalis</i>		•		•									
<i>HPV</i>	•												
<i>HSV 1,2</i>	•	•	•	•		•	•	•				•	
<i>Lactobacillus spp.</i>				•									
<i>Mobiluncus curtisii</i>				•									
<i>Mycoplasma genitalium</i>		•		•		•	•						
<i>Mycoplasma hominis</i>		•		•		•	•						
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	•	•	•		•	•	•						
<i>Toxoplasma gondii</i>								•				•	•
<i>Trichomonas vaginalis</i>	•	•		•		•							
<i>Ureaplasma urealyticum</i>		•		•		•	•						
<i>Escherichia coli</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Proteus spp.</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Enterococcus faecalis, E. faecium</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Enterobacter spp., Klebsiella spp.</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Serratia spp.</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Staphylococcus aureus</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Streptococcus spp.</i>	•	•		•	•	•	•	•			•		•
<i>Streptococcus pyogenes</i>					•			•			•		

<i>Atopobium vaginae</i>	•	•		•			•							
<i>Chlamydia pneumoniae</i>					•			•			•			
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>			•		•			•			•			
<i>Listeria spp.</i>	•	•		•			•		•				•	•
<i>Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis</i>								•			•			
Резистентность Enterobacteriaceae к цефалоспорином	•	•		•	•	•	•	•			•			
Резистентность Staphylococcus aureus к цефалоспорином	•	•		•	•	•	•	•			•			

материал	Взятие образца для анализа	Хранение, транспортировка
мазки, соскобы	образцы помещаются <u>непосредственно в пробирки с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС»</u> .	неохлажденные пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК. Допускается хранение биопроб при +4...+8°C - не более 1 суток, при -18...-20°C - не более 2-х недель.
сперма, секрет простаты	Образцы собираются в одноразовую сухую стерильную пробирку.	
моча	собрать первую и среднюю порцию утренней мочи в количестве 20 мл в сухой стерильный флакон с плотно завинчивающейся крышкой	моча для исследования должна быть свежей (<i>не охлаждать и не замораживать!</i>). До получения осадка исходный материал образец должен быть доставлен в лабораторию как можно быстрее.
слина, ликвор, синовиальная жидкость	отобрать 1-1,5 мл исходного материала в сухую стерильную пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл;	материал для исследования должен быть свежим (<i>не охлаждать и не замораживать!</i>)
смывы	Собрать в одноразовые плотно завинчивающиеся пробирки в количестве 50 мл	
мокрота, плевральная жидкость	собрать 10 мл в пластиковую центрифужную пробирку объемом 50 мл с плотно завинчивающейся крышкой	
лейкоцитарная масса крови, цельная кровь	500 мкл венозной крови собрать в одноразовую пластиковую пробирку с 50 мкл раствора антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА или 4% раствор цитрата натрия). <i>Гепарин использовать не рекомендуется.</i>	неохлажденные пробы использовать в течение 2-х часов для выделения ДНК; хранить при +4...+8°C - не более 1 суток; <i>не замораживать!</i>

7.3. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА МАТЕРИАЛА

- Образцы **мазков и соскобов** в пробирке с «ДНК-ЭКСПРЕСС» не требуют предварительной обработки.
- Образцы **спермы и секрета простаты**: 20-30 (максимум 50) мкл жидкого образца внести пипеткой в пробирку с 300 мкл реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС».
- Получение осадка **мочи**:
 Весь объем первой и средней порции мочи тщательно взболтать и 10-15 мл отобрать в стерильную центрифужную пробирку. Центрифугировать 15-20 мин при 1500-3000 об/мин, надосадочную жидкость осторожно удалить, стараясь не захватить на дне 0,5-1 мл суспензии.
 Суспензию осадка (0,5-1 мл) перенести в одноразовую пробирку типа Эппендорф (1,5 мл), пробирку плотно закрыть и центрифугировать при 8000–14000 об/мин при комнатной температуре в течение 15 сек.
 Тщательно удалить пипеткой надосадочную жидкость.
 При необходимости (подозрение на охлаждение исходной мочи) можно однократно промыть осадок: добавить к осадку 200-300 мкл физ. раствора, ресуспендировать на вортексе, отцентрифугировать и удалить надосадочную жидкость.

К осадку в пробирке (20-30, но не более 50 мкл) добавить весь реагент (300 мкл) из одной пробирки из комплекта “ДНК-ЭКСПРЕСС”, тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.

- Образцы **смывов** обрабатывают для получения осадка так же, как описано для мочи.
- Пробирки с образцами **слюны, ликвора, синовиальной жидкости** отцентрифугировать в течение 10-15 минут при 12000 об/мин, тщательно удалить пипеткой верхний слой жидкости, оставив на дне около 20-30 (но не более 50) мкл. К оставшейся в пробирке жидкой взвеси добавить весь реагент (300 мкл) из одной пробирки из комплекта “ДНК-ЭКСПРЕСС”, тщательно перемешать пипетированием и полученную суспензию перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой;
- К образцам **мокроты, плевральной жидкости** в центрифужной пробирке объемом 50 мл добавить равный объем реагента NALC, перемешать на вортексе в течение 5-20 секунд, инкубировать 15 минут при комнатной температуре, а затем развести 0.067M фосфатным буфером (pH 6.8) до 50 мл, центрифугировать 15 минут при 3000 об/мин, удалить надосадочный раствор. К осадку в пробирке (20-30, но не более 50 мкл) добавить весь реагент (300 мкл) из одной пробирки из комплекта “ДНК-ЭКСПРЕСС”, тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.
Реагент NALC (на 5 проб мокроты): 0.25 г ацетилцистеина, 25 мл 4% NaOH, 25 мл 0.1M триNa цитрата (готовые исходные растворы на 100 образцов входят в состав “Комплекта для разжижения мокроты” кат № 030302, “ЛИТЕХ”). Смесь готовят в день использования (раствор не хранится).
- Пробирку с образцом **крови** с антикоагулянтом для получения лейкоцитарной массы аккуратно встряхнуть для перемешивания крови с антикоагулянтом, центрифугировать в течение 5 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре. Плазму (верхняя фаза) отбрасывают с использованием индивидуального наконечника. Полученную клеточную массу крови (нижняя фаза) необходимо отмыть от эритроцитов. Методика отмывки: К 300 мкл осадка клеточной массы крови добавить 1 мл буфера (10мM трис-HCl, 5мM MgCl₂, 10мM NaCl) и оставить на 20 мин при комнатной температуре до полного гемолиза эритроцитов. Отцентрифугировать 5 мин при 3000 об/мин. Процедуру повторить 2 раза. К осадку в пробирке (20-30, но не более 50 мкл) добавить весь реагент (300 мкл) из одной пробирки из комплекта “ДНК-ЭКСПРЕСС”, тщательно перемешать пипетированием и образовавшуюся взвесь перенести обратно в пробирку с защелкивающейся крышкой.

Хранение предварительно обработанных проб в реагенте «ДНК-ЭКСПРЕСС»: при +4...+8°C - не более 1 суток, при -18...-20°C - не более 2-х недель.

Доставка проб в лабораторию должна проводиться в термосе со льдом или в термоконтейнере в течение 12 часов.

7.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

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

7.4.2. Пробирку с перемешанным содержимым поместить в твердотельный термостат, предварительно прогретый до 98°C и прогреть при 98°C в течение 20 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°C.

7.4.3. После прогрева пробирки перенести в высокоскоростную микроцентрифугу и центрифугировать при 12000-16000g (8000-14000 об/мин) при комнатной температуре в течение 20-30 сек.

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

Обработанные таким образом пробы хранить при температуре +2...+8°C в течение одной недели или при температуре -10...-20°C в течение 6 мес.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Проведение ПЦР-амплификации

8.1.1. Комплектация «Нераскапанный».

8.1.1.1. Приготовить и, при возможности, пронумеровать бесцветные пробирки (в зависимости от типа прибора могут потребоваться оптические пробирки или пробирки с оптическими крышками) вместимостью 0,2 мл или другой емкости (согласно инструкции к прибору и соответствующему приложению настоящей инструкции, далее ПРИЛОЖЕНИЮ) для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК, отрицательного контрольного образца и, при необходимости, фоновые пробирки

Чаще всего при проведении ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени нанесение надписей на пробирки недопустимо. В этом случае пробирки расставляются в штативе точно в том порядке, в котором они будут стоять в приборе, и составляется карта расположения образцов.

8.1.1.2. За 20-30 мин 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.

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

8.1.1.3. Приготовить рабочую смесь, смешав нужные количества разбавителя и реакционной смеси в соотношении 3:1 (необходимые количества для каждого прибора, к которому адаптирован набор, указаны в ПРИЛОЖЕНИИ) и тщательно перемешать пипетированием (если объем смеси <200 мкл) или вортексированием.

Разбавитель, мкл	15	30	60	300
5x реакционная смесь, мкл	5	10	20	100
Объем рабочей смеси, мкл	20	40	80	400

8.1.1.4. Если требуется приготовление фоновых пробирок, в каждую из них необходимо внести указанный в ПРИЛОЖЕНИИ объем рабочей смеси.

8.1.1.5. В оставшуюся рабочую смесь внести Taq-полимеразу. Вносимый объем должен составлять 1/100 от объема имеющийся рабочей смеси. Смесь тщательно перемешать пипетированием (если объем <200 мкл) или вортексированием.

Объем рабочей смеси, мкл	20	40	80	400
Taq-полимераза, мкл	0,2	0,4	0,8	4

8.1.1.6. Внести в приготовленные пробирки, кроме фоновых, указанный в ПРИЛОЖЕНИИ объем полученной рабочей смеси.

Объем рабочей смеси на образец, мкл	Объем образцов в мкл			Примеры приборов
	Исслед.	К-	К+	
20	5	5	5	Rotor Gene 3000, Rotor Gene 6000 , (Corbett Research), Rotor Gene Q (Qiagen)
40	10	10	10	MiniOpticon, IQ, IQ5, CFX 96 (BioRad), ПЦР БИОМС-01 (БиоМедСиб), ДТ-96, ДТ-322 (ДНК-Технология)
80	20	20	20	Cobas TaqMan 48 (Roche)

8.1.1.7. При необходимости (см. ПРИЛОЖЕНИЕ) добавить во все пробирки указанное в ПРИЛОЖЕНИИ количество минерального масла.

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

а) при необходимости, (см. ПРИЛОЖЕНИЕ) в фоновые пробирки - при выделении ДНК из образцов неокрашенным реагентом «ДНК-экспресс» в фоновые пробирки вносится разбавитель. В других случаях вносится реагент, в котором растворена ДНК исследуемых образцов, например, буфер TE, деионизованная вода или др. реагенты;

б) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

в) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

г) (опционально; необходимо для количественного анализа) в пробирки стандартных образцов - стандартные образцы с известной концентрацией ДНК (в состав набора не входят).

д) в пробирку положительного контрольного образца – положительный контрольный образец ДНК из комплекта набора.

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

8.1.1.9. Пробирки закрыть (если это не было сделано ранее) и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250 – 4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18...+ 25°C) на микроцентрифуге-вортексе или иной, предназначенной для данных пробирок центрифуге.

8.1.1.10. Перенести пробирки в анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени и провести амплификацию и детекцию согласно ПРИЛОЖЕНИЮ.

8.2. Перенести пробирки в прибор.

Амплификацию следует проводить по следующей программе (в ПРИЛОЖЕНИИ приведен ее вид для конкретного прибора):

+94 °C	1 мин 30 сек			
+94 °C	10 сек			
+64 °C	10 сек			40 циклов
+72 °C	40 сек			
+50 °C	считывание			

8.3. Детекция продуктов амплификации

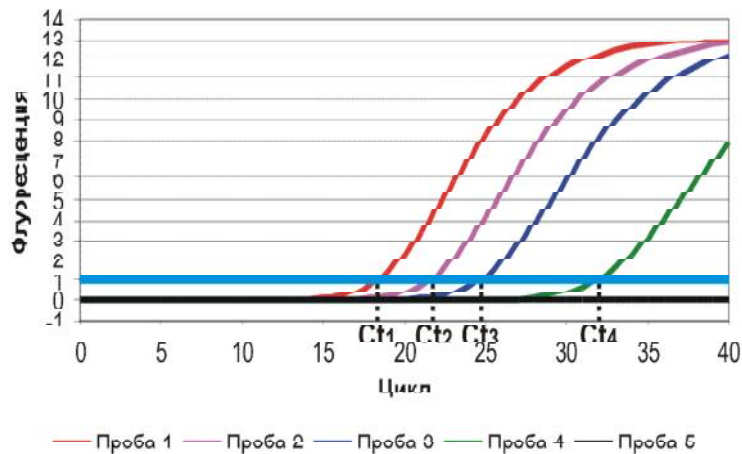
8.3.1. При проведении ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени измерения проводятся в каждом цикле амплификации. По завершении реакции прибор строит на основе полученных данных кривые накопления флуоресцентного сигнала.

8.4. Анализ и интерпретация результатов

Внимание! В наборах ФЛУОРОПОЛ используется система внутреннего контроля, матрицей для которой служит геномная ДНК человека, поступающая вместе с пробой. Таким способом осуществляется одновременный контроль, как за протеканием реакции, так и за стадией выделения ДНК. Поэтому отсутствие сигнала внутреннего контроля от положительного и отрицательного контрольных образцов, при постановке стандартных образцов, контрольных и стандартных панелей, а также анализе бактериальных культур является нормальным. Присутствие внутреннего сигнала контроля в перечисленных типах образцов свидетельствует о контаминации геномной ДНК человека, что не оказывает влияния на анализ результатов, поскольку соответствует стандартной ситуации, когда матрица внутреннего контроля вводится в смесь на стадии производства. Также является допустимым слабый сигнал внутреннего контроля от положительных (особенно, сильно-положительных) образцов, что связано с конкуренцией за фермент.

8.4.1. Анализ продуктов ПЦР в реальном времени производится на основе кривых накопления флуоресцентного сигнала (п. **8.3.1.**) следующим образом (далее в тексте могут приводиться некоторые стандартные общепринятые англоязычные термины и обозначения, широко используемые в программах значительного количества производителей приборов для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени; они заключены в скобки и выделены курсивом):

- а) Вычитание базовой линии (*Baseline*).** Позволяет вычесть из сигнала фон в предположении, что для всей кривой он представляет прямую линию. Проводится программой на основании заданных пользователем параметров.
- б) Вычитание фоновой пробирки** (если такая функция есть в программе). Позволяет провести более точное вычитание фона с учетом его нелинейности, а также избавиться от некоторых артефактов на кривых накопления фонового сигнала (например, «провалов», вызванных кратковременным сбоем во всей системе регистрации сигнала). Проводится программой автоматически; иногда пользователь должен активировать данную функцию.
- в) Выставление пороговой линии (*Threshold*).** Некоторые программы имеют часть установок по умолчанию или алгоритмы автоматического выставления пороговой линии. При работе с наборами ФЛУОРОПОЛ настоятельно рекомендуется выставлять пороговую линию вручную согласно рекомендациям производителя набора (это позволяет стандартизовать интерпретацию полученных данных).
- г) Программа автоматически рассчитывает для каждой обработанной кривой накопления фонового сигнала **цикл пересечения с пороговой линией (*Ct*)**.** Эта величина численно характеризует протекание реакции и может быть нецелочисленной. На ее основе идет дальнейший анализ и интерпретация результата.



- д) При качественном анализе значение цикла пересечения с пороговой линией сопоставляется со значением конечного цикла (КЦ), определяемого производителем набора. Такой подход позволяет использовать единую программу амплификации для всех наборов ФЛУОРОПОЛ, а также исключить из рассмотрения возможное появление неспецифического сигнала и нивелировать слабую контаминацию.
- е) В случае, когда кривая фонового сигнала не пересекает пороговую линию, или точка пересечения находится после конечного цикла, считается, что реакция не прошла. При количественном анализе программа автоматически строит калибровочную кривую зависимости циклов пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала стандартных образцов с пороговой линией от логарифмов концентрации стандартных образцов и по этой кривой определяет концентрацию анализируемых образцов.

8.4.2. При проведении **качественного анализа** продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо выставить в соответствии с указаниями производителя набора (см. ПРИЛОЖЕНИЕ) параметры:

- вычитания базовой линии (*Baseline*);
- вычитания фоновых пробирок (в зависимости от прибора);
- установки пороговой линии (*Threshold*);
- дополнительные параметры (в зависимости от прибора).

Примечание: параметры анализа для разных возбудителей и внутреннего контроля могут отличаться.

После этого программа рассчитывает точки пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (C_t) и выдает их численные значения в циклах (значения могут быть нецелочисленными). Для интерпретации результата необходимо сравнить полученные значения C_t с указанными для данного набора в ПРИЛОЖЕНИИ и провести анализ согласно таблицам.

Интерпретация результатов:

В таблице использованы следующие обозначения:

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

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

HЗ – 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.

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

8.4.3. При проведении **количественного анализа** продуктов ПЦР в режиме реального времени (это возможно, если постановка реакции проводилась не менее чем с двумя стандартными образцами) необходимо выставить в соответствии с указаниями производителя набора (см. ПРИЛОЖЕНИЕ) параметры:

- а) вычитания базовой линии (*Baseline*);
- б) вычитания фоновых пробирок (в зависимости от прибора);
- в) установки пороговой линии (*Threshold*);
- г) концентрации стандартных образцов, если это не было сделано (или не могло быть сделано) при создании протокола;
- д) дополнительные параметры (в зависимости от прибора).

Примечание. Параметры анализа для разных возбудителей и внутреннего контроля могут отличаться.

После этого программа рассчитывает точки пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (C_t) и выдает их численные значения в циклах (значения могут быть нецелочисленными). Если значения концентрации ДНК в стандартных образцах были заданы должным образом, программа построит по их концентрациям и C_t калибровочную кривую и по ней рассчитает концентрации ДНК в исследуемых образцах.

	Содержание ДНК	C_t НЭК	Результат
К+	\geq чувствит.	любой	Специфическая реакция прошла
	НЗ или $<$ чувствит.	любой	Специфическая реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	\geq чувствит.	$<$ КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ .
К-	НЗ или $<$ чувствит	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	\geq чувствит.	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или $<$ чувствит	$<$ КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ .
Анализируемый образец	\geq чувствит.	любой	ПРИСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	НЗ или $<$ чувствит.	$<$ КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	НЗ или $<$ чувствит.	$>$ КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.
NTC	НЕ ИНТЕРПРЕТИРУЕТСЯ		

Внимание! Надежными можно считать концентрации только тех образцов, значения C_t для которых лежат между максимальным и минимальным значениями C_t для стандартных образцов.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Реагент ДНК-ЭКСПРЕСС должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2...+8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение реагента при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 сут.

9.2. Комплекты для проведения амплификации должны храниться при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение комплектов при температуре не выше 0°C не более 2,5 сут.

9.3. Срок годности наборов формата «базовый» – 6 месяцев, «One Step» – 4 месяца со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя.

9.4. Обработанные (прошедшие выделение ДНК) пробы можно хранить при температуре от $+2...+8^{\circ}\text{C}$ не более одной недели или при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ не более 6 месяцев.

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

По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов ФЛУОРОПОЛ.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д.1, стр.3, телефон/факс: (495) 589-14-03, e-mail: info@lytech.ru

Проведение ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени при помощи системы детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени «Cobas TaqMan 48» (Roche)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Система детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени «Cobas TaqMan 48» представляет собой два независимых программируемых термостата (амплификатора), сопряженных с независимыми же многоканальными оптическими системами детекции флуоресцентного сигнала через стенки пробирок. Система позволяет проводить ПЦР и регистрировать сигнал от образцов в каждом цикле. По окончании реакции управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала от каждого образца в каждом канале, по которым в дальнейшем и производится анализ результатов. Для работы с наборами ФЛУОРОПОЛ используются каналы F1 (FAM – специфический сигнал) и F2 (HEX – сигнал внутреннего контроля).

В данном приложении указаны только операции, необходимые для использования прибора и его программного обеспечения для работы с наборами ФЛУОРОПОЛ. За дополнительной информацией следует обращаться к инструкции по использованию прибора или к его изготовителям.

2. ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

Внимание! Управляющая программа прибора может работать не более чем с 10 пользовательскими программами. Ненужная более программа может быть изменена или удалена не менее чем через неделю после последнего использования (за более подробной информацией следует обращаться к инструкции к используемой версии управляющей программы или производителям прибора).

2.1. Создание новой программы

2.1.1. Включить управляющий компьютер и запустить программу AMPLILINK.

2.1.2. (рис.1) Нажать кнопку Configuration (A), перейти на вкладку Lab Definitions (B), выбрать Test Definitions

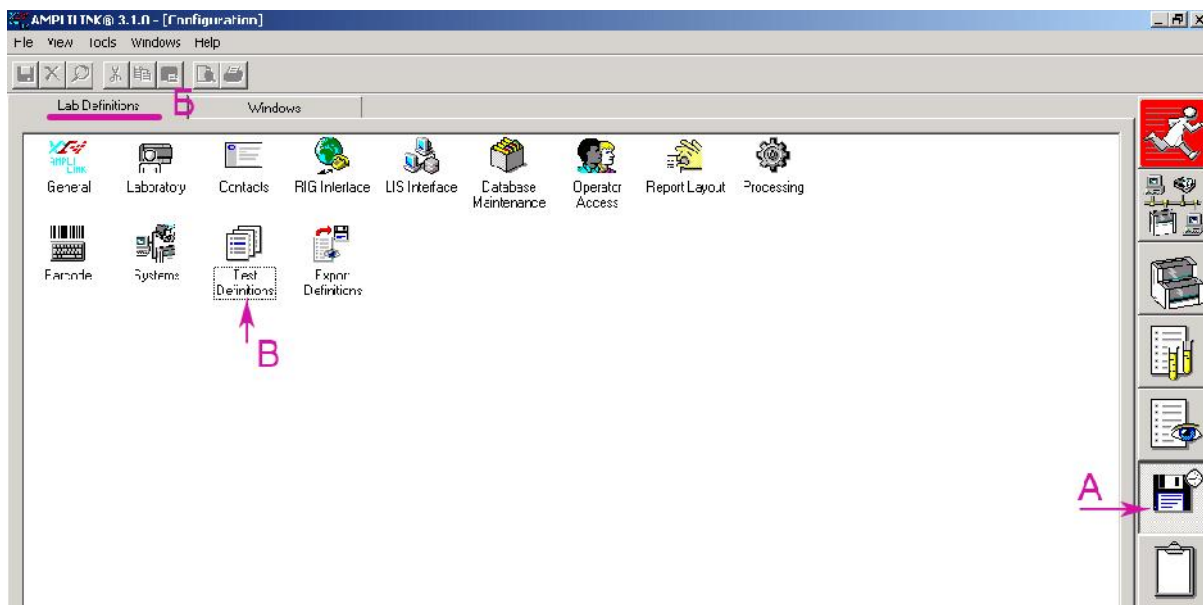


Рис. 1

Открывается окно Test Definitions Configuration (Рис.2).

2.1.3. (рис. 2) В левой части окна Test Definitions Configuration выбрать из списка шаблон UTILCHAN (А), скопировать (Б) и присвоить новое имя в графе Test Name (В). Имя новой программы появится в списке

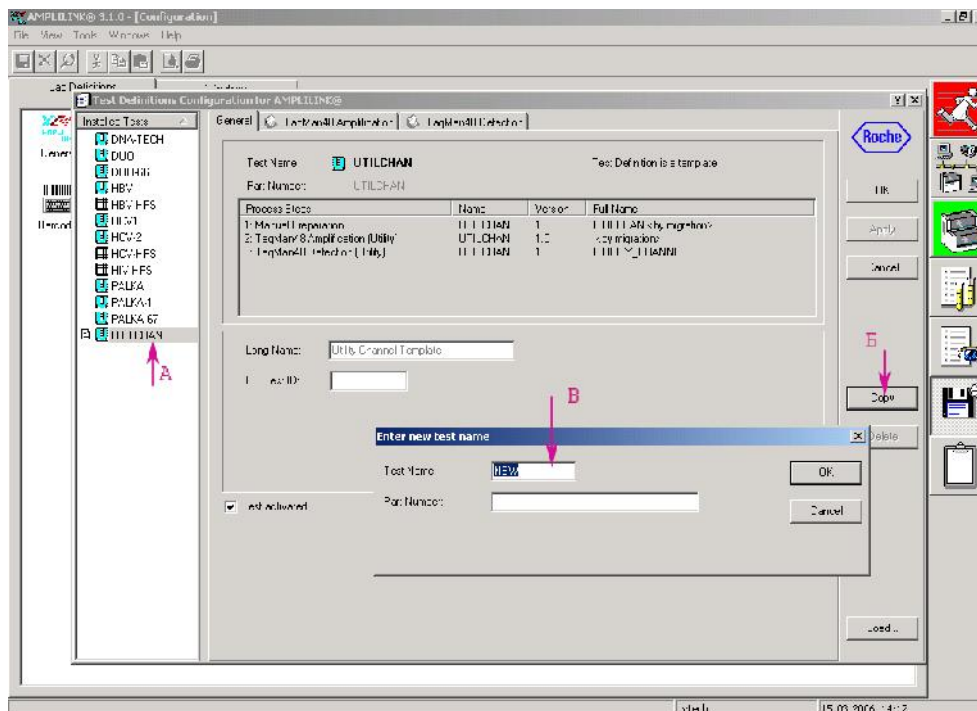


Рис.2

2.1.4. (рис.3.) Перейти на вкладку TaqMan48 Amplification (А). Ввести программу (профиль) амплификации согласно шагам, предлагаемым программой, используя кнопку Add (Б). Ступени программы в процессе введения можно удалять (Delete), передвигать вверх (Move Up) или вниз (Move Down). По окончании введения программы нажать кнопку Apply (В). Нажать кнопку ОК (Г).

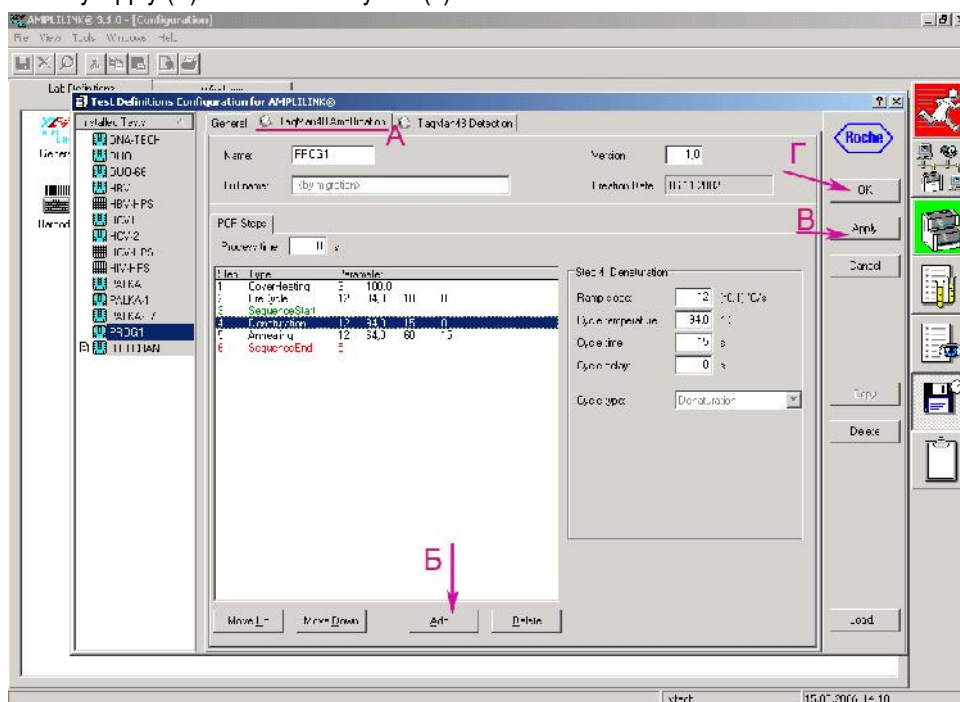


Рис.3

При использовании наборов ФЛУОРОПОЛ для всех инфекций следует применять следующую программу:

		Ramp Slope *0,1°C	T, °C	sec	delay
1.	Cover heating	3	100		
2.	PreCycle	12	94	90	0
3.	Sequence start				
4.	Denaturation	12	94	10	0
5.	Annealing	12	64	10	10
6.	Extention	12	72	20	0

8.	SequenceEnd		40 (количество циклов)		
9.	PostCycle	12	40	120	0

2.1.5. (рис.4) Выбрать введенную программу из списка (А), перейти на вкладку General (Б). В нижней части окна установить флажок в позиции Test Activated (В). Нажать кнопку ОК (Г).

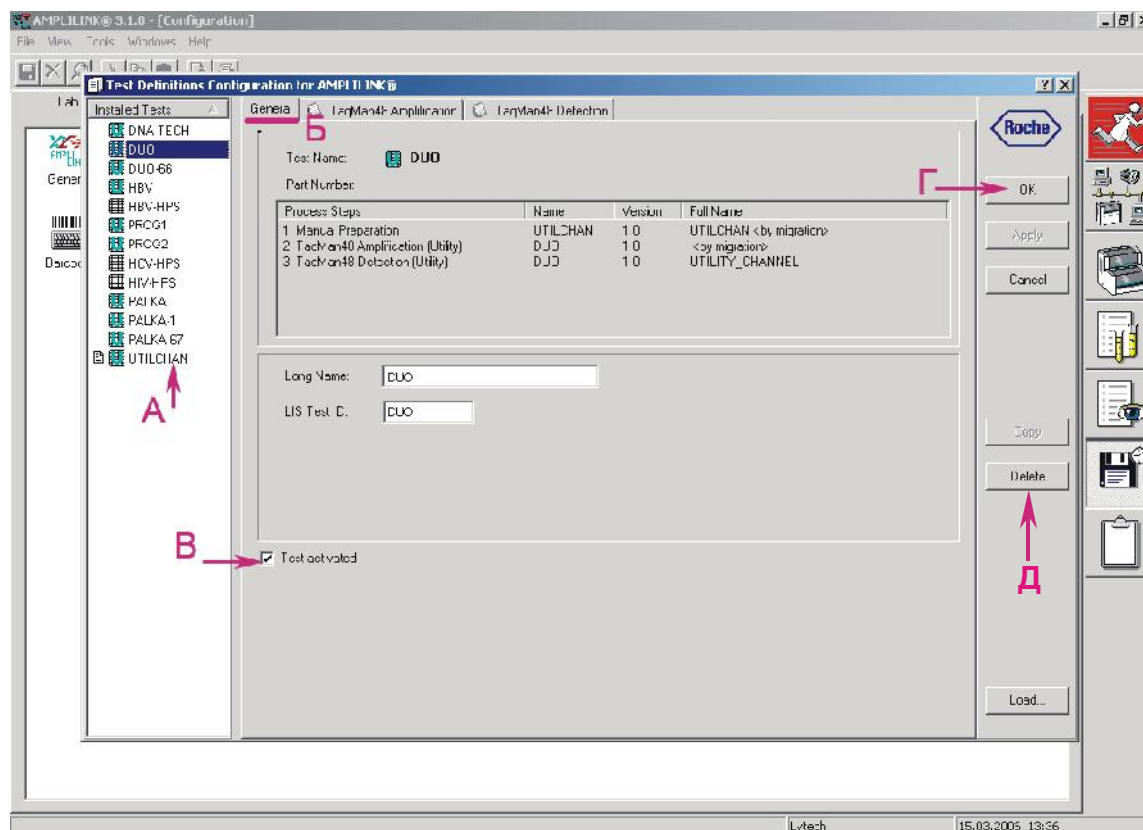


Рис.4

Внимание! Ненужная более программа может быть изменена или удалена не менее чем через неделю после последнего использования (за более подробной информацией следует обращаться к инструкции к используемой версии управляющей программы или производителям прибора).

2.2. Редактирование существующей программы

2.2.1. (рис.4) Выбрать введенную программу из списка (А).

2.2.2. (рис.3.) Перейти на вкладку TaqMan48 Amplification (А). Ввести программу (профиль) амплификации согласно шагам, предлагаемым программой, используя кнопку Add (Б). Ступени программы в процессе введения можно удалять (Delete), передвигать вверх (Move Up) или вниз (Move Down). По окончании редактирования программы нажать кнопку Apply (В). Нажать кнопку ОК (Г).

2.2.3. (рис.4) Выбрать введенную программу из списка (А), перейти на вкладку General (Б). В нижней части окна установить флажок в позиции Test Activated (В). Нажать кнопку ОК (Г).

2.3. Удаление программы

2.3.1. (рис.4) Выбрать введенную программу из списка (А), перейти на вкладку General (Б). Нажать кнопку Delete (Д).

3. СОЗДАНИЕ РАБОЧЕГО ПРОТОКОЛА

3.1. (Рис. 5.) В окне программы AMPLILINK нажать кнопку Orders (А), затем выбрать вкладку K-carrier (Б), нажать кнопку New (В). В поле K-carrier (Г) ID внести номер К-штатива (указан на боковой панели К-штатива).

Примечание. При проведении количественного анализа рекомендуется размещать в одном штативе пробирки, относящиеся к одному возбудителю, а при проведении качественного – пробирки наборов, при анализе результатов которых используются одинаковые параметры (Threshold, Конечный цикл согласно таблице на странице 82 в п.6.2.8.). Эта рекомендация не является строгой и призвана лишь облегчить дальнейшую работу.

Конечный цикл	Threshold
---------------	-----------

3.2. В середине окна в таблице в графе Sample ID (Д) внести номера проб, обозначение стандартов, положительных и отрицательных контролей в соответствии с расположением проб в штативе. Стандарты, положительные и отрицательные контроли должны обязательно стоять в том же штативе, что и анализируемые пробы, в противном случае они не будут участвовать в анализе и не попадут в отчет.

3.3. В нижней части окна (Tests) выбрать внесенное ранее имя программы амплификации (Е). Нажать кнопку Save (Ж).

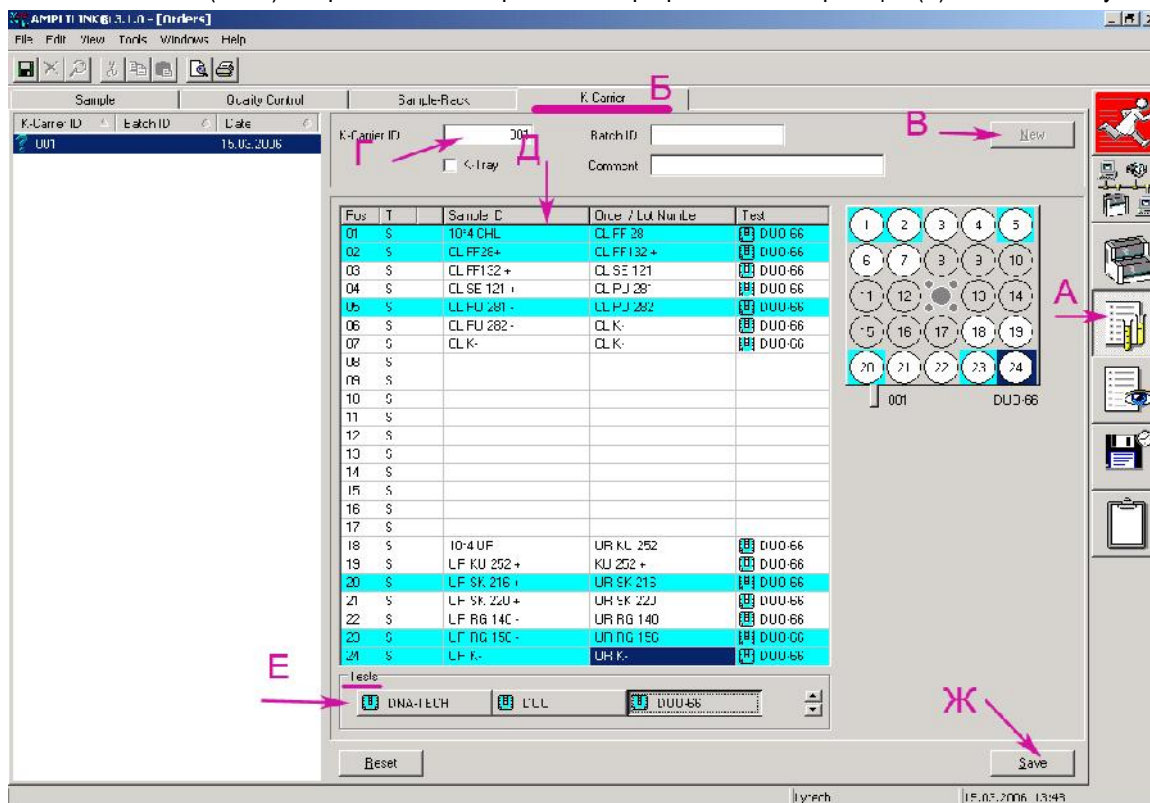


Рис. 5

3.4. Заданное в программе расположение пробирок следует отметить в предлагаемом бланке и далее пользоваться им для адекватной расстановки пробирок в штативе.

1	2	3	4	5
6	7	8	9	10
11	12		13	14
15	16	17	18	19
20	21	22	23	24

4. ПОСТАНОВКА РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

4.1. За 20-30 минут до приготовления рабочей амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени из морозильника, разморозить содержимое. Пробирки с реакционной смесью и полностью размороженным раствором разбавителя тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

4.2 Приготовить К-пробирки в соответствии с количеством анализируемых проб и контрольных образцов. Расставить К-пробирки в ячейки К-штатива (K-carrier).

Внимание! К-пробирки следует брать **только за крышку, боковые стенки и дно пробирок руками не трогать!!!**

4.3. Из компонентов набора приготовить смесь реагентов для амплификации согласно таблице:

Количество пробирок	1	5	10	15	20	24
Разбавитель, мкл	60	300	600	900	1200	1440
5x реакционная смесь, мкл	20	100	200	300	400	480
Таq-полимераза, мкл	0,8	4	8	12	16	19,2

При приготовлении рабочей амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

4.4. После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием, при объеме смеси менее 200 мкл, либо вортексированием.

4.5. Снять крышки с подготовленных К-пробирок, расставленных в штативе, с помощью специальной отвертки (*K-tube Carrier*). Снятые крышки разместить в ячейках пластиковой подставки для К-штатива, сохраняя порядок в соответствии с расположением К-пробирок в ячейках К-штатива.

4.6. Добавить по 80 мкл приготовленной рабочей амплификационной смеси во все К-пробирки.

4.7. Добавить согласно заполненному бланку расположения (п.3.4.) во все пробирки индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами по 20 мкл (после внесения каждой пробы аккуратно 2-3 пипетированиями смешать пробу с рабочей смесью):

а) в пробирку отрицательного контрольного образца – разбавитель;

б) в пробирки исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;

в) (опционально; необходимо для количественного анализа) в пробирки стандартных образцов – стандартные образцы с известной концентрацией ДНК (в состав набора не входят).

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

4.8. Закрыть К-пробирки соответствующими крышками с помощью отвертки (*K-tube Carrier*).

4.9. (рис.6) Нажать кнопку Standby (А). В новом окне на вкладке System (Б) нажать кнопку Open (В).

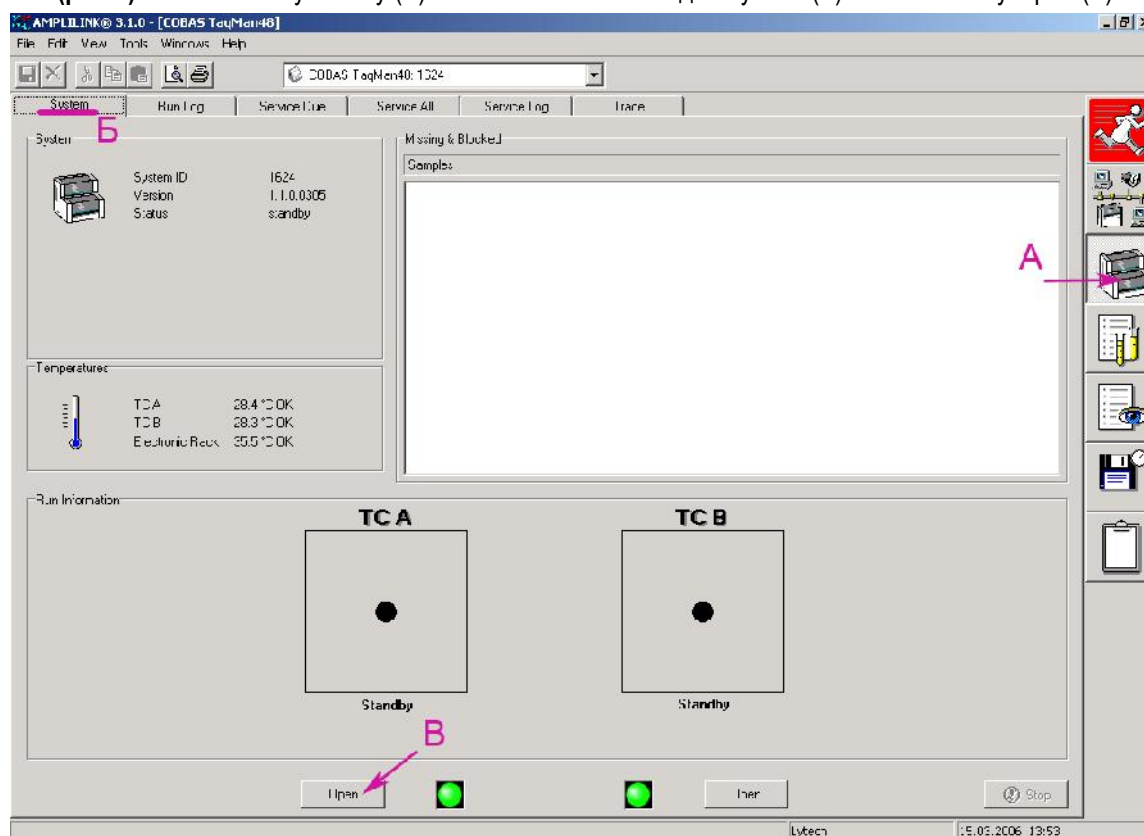


Рис.6

4.10. Открыть крышку анализатора. Поместить К-штатив (*K-carrier*) с подготовленными образцами в термоблок с помощью устройства для переноса платформы в термоблок (*K-carrier Transporter*).

4.11. Закрыть крышку анализатора. В окне программы нажать кнопку Close. Запустить выполнение программы амплификации нажатием кнопки Start. Появляется надпись Running и фон в квадрате становится зеленым. (рис. 7)

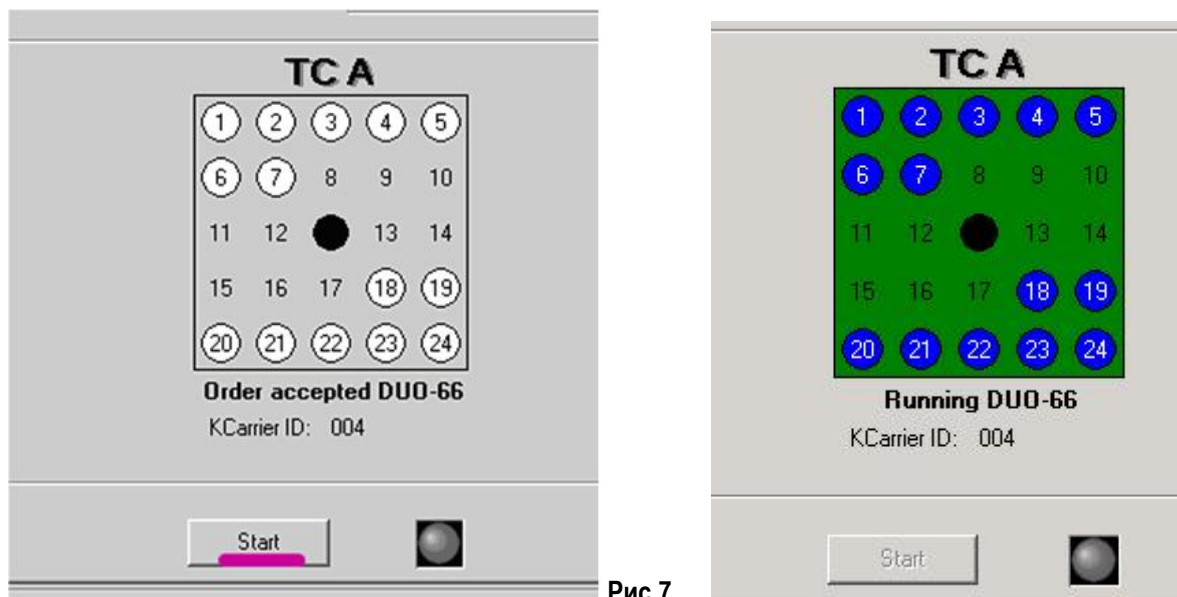


Рис.7

4.12. (Рис. 8) После завершения программы на передней панели анализатора и в окне программы загорается желтая лампочка (А) и появляется надпись Finished. Нажать кнопку Open (Б). Открыть крышку анализатора на приборе. Вынуть К-штатив с пробирками с помощью *K-carrier Transporter* и поместить его на пластиковую подставку для К-штатива. **Внимание!** К-штатив горячий – руками не трогать. Крышку анализатора закрыть.

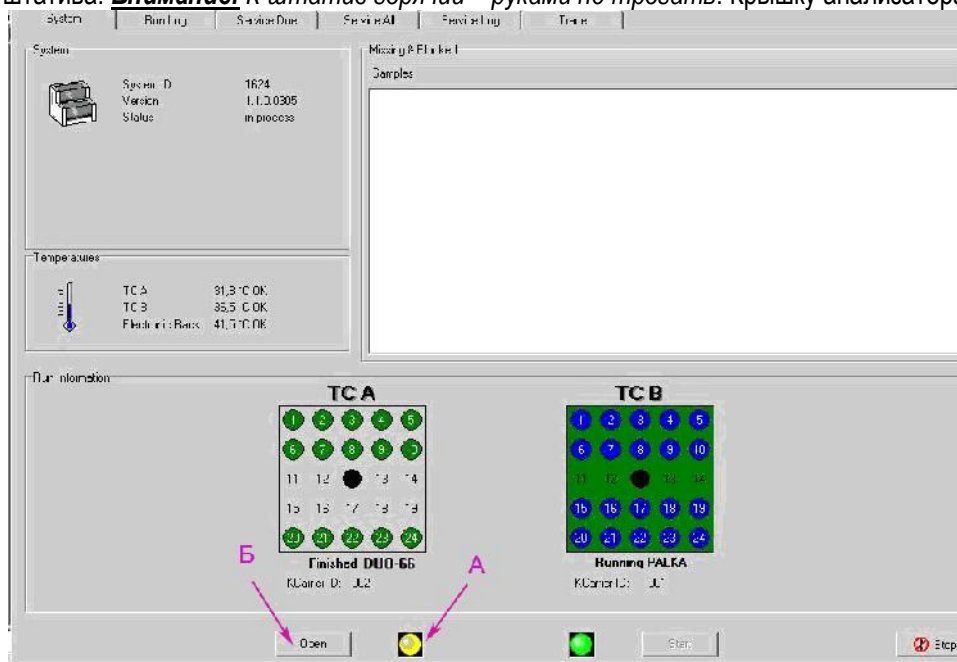


Рис.8

5. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

6. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.1. Экспорт данных для анализа



6.1.1. (рис. 9) В окне программы AMPLILINK нажать кнопку Results , затем выбрать вкладку Review (A).

6.1.2. В поле в левой части появившегося окна выбрать соответствующие текущему эксперименту № К-штатива, дату и время (Б).

6.1.3. В правой части окна появится таблица с описанием образцов, анализируемых в текущем эксперименте. Необходимо выделить все образцы (B) и нажать кнопку Ассерпт (Г).

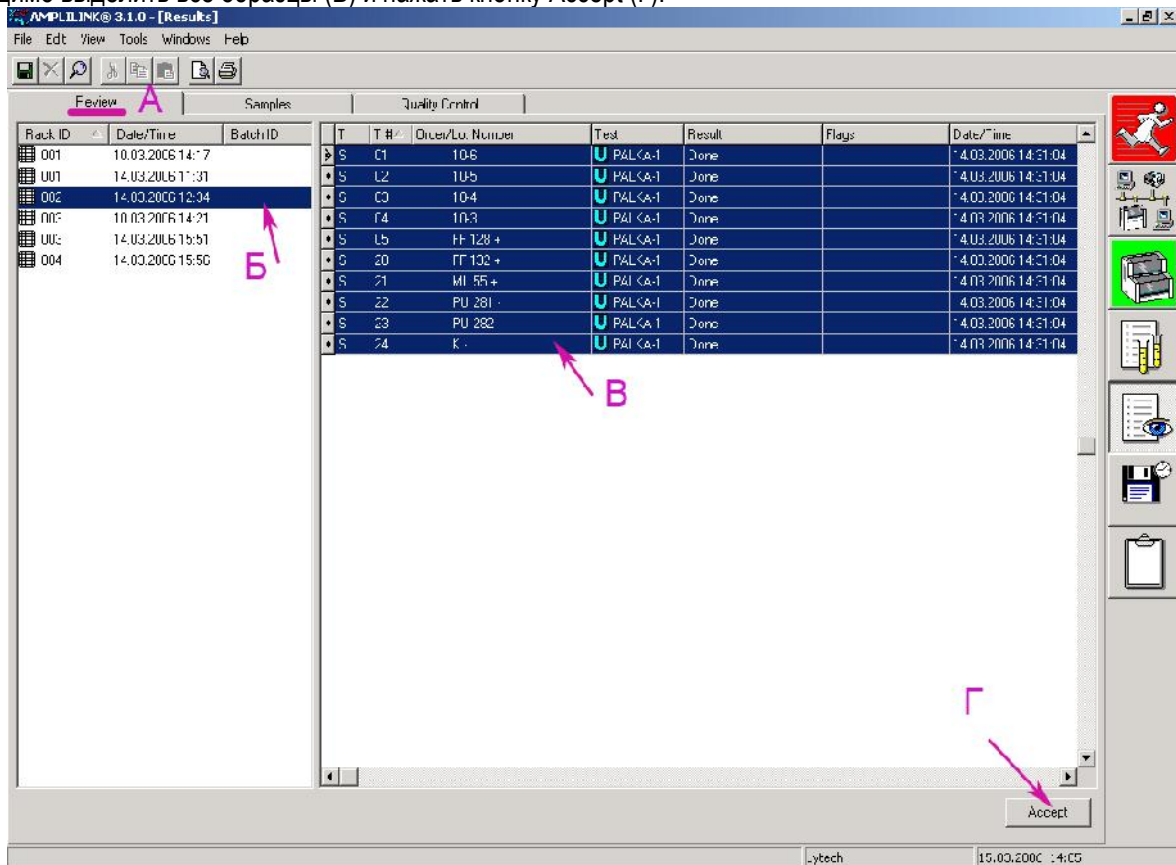


Рис.9

6.1.4. (Рис. 10) Выбрать в пункте меню File >>Export Raw Data на верхней панели окна. Присвоить имя файлу и сохранить полученные данные для последующего анализа (архивный файл *.zip).

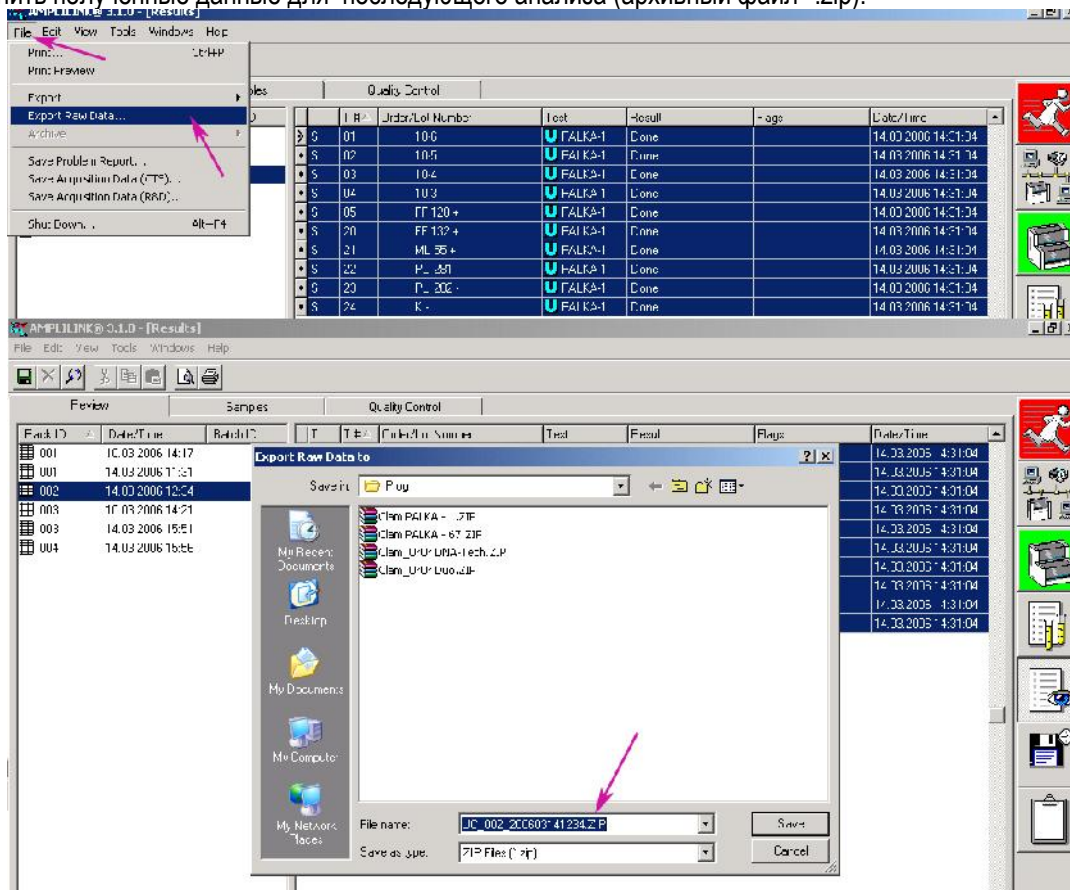


Рис.10

После экспортирования рекомендуется удалить введенные данные о порядке образцов и программе амплификации из памяти: Orders >Delete (в последних версиях программы удаление возможно только по истечении нескольких дней. Для получения более подробной информации следует обращаться к инструкции к программе и производителю прибора).

6.2. Анализ результатов.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению Utility Channel Data Analysis.

6.2.1. Запустить программу Utility Channel Data Analysis.

6.2.2. Открыть необходимый файл с результатами.

6.2.3. В открывшемся окне (рис. 11) для отрицательного контрольного образца в графе Sample Type выбрать из списка значение Negative, для положительного контрольного образца – значение Positive. Для ячеек, содержащих анализируемые образцы, в графе Sample Type должно быть поставлено значение Unknown.

Значение Standard предназначено для программ, в которых используются положительные контрольные образцы с известной концентрацией; как и колонка Conc., нужная для указания концентрации в стандартных образцах.

Примечание. Если при проведении количественного анализа в штативе находятся пробирки, относящиеся к тестам на разных возбудителей, обозначать стандартные образцы и указывать их концентрации следует только для одной системы.

6.2.4. В окне Channel Data translator выбрать каналы для обчета (Output Channels) F1, F2, и F4 (A) и нажать кнопку Translate File (Б). В открывшемся окне нажать кнопку Save.

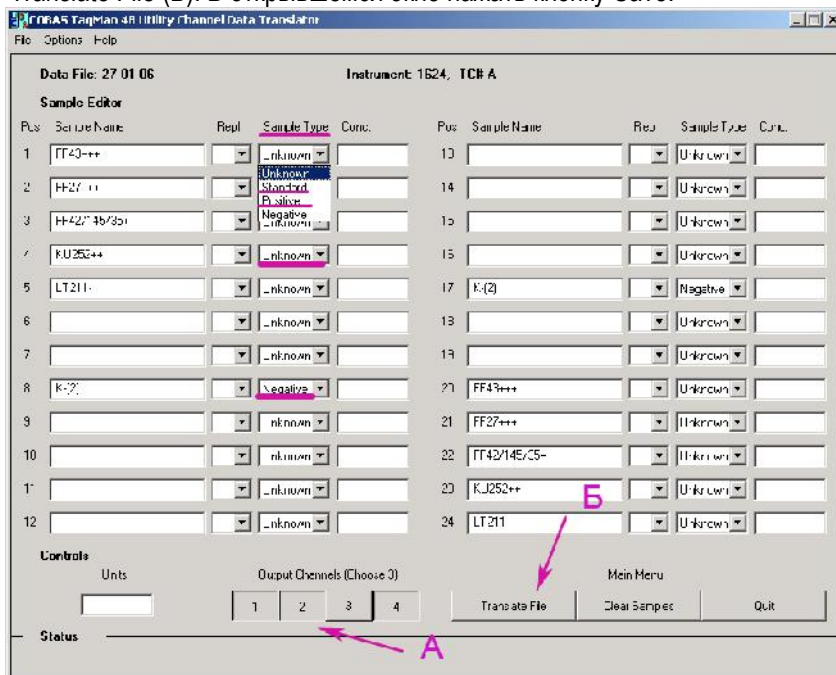


Рис. 11

6.2.5. В открывшемся окне (Рис. 12) на верхнем графике (температура-время) вручную передвинуть вертикальные зеленые линии (A) таким образом, чтобы начало и конец кривых накопления сигнала в нижнем окне соответствовали начальному и конечному циклам из таблицы (п.6.2.8.). Данная процедура исключает начальные и конечные циклы амплификации из анализа, поскольку на этих циклах возможны значительные артефактные колебания уровня флуоресценции, а также выход неспецифического сигнала. Кроме того, отсечение нужного числа последних циклов позволяет нивелировать влияние слабой контаминации.

6.2.6. В поле Fluorescence в левой нижней части окна выбрать канал F2 (флуорофор HEX – анализ накопления фрагмента внутреннего контроля) (Б).

6.2.7. После этого нажать кнопку Quantification в верхней части окна (B).

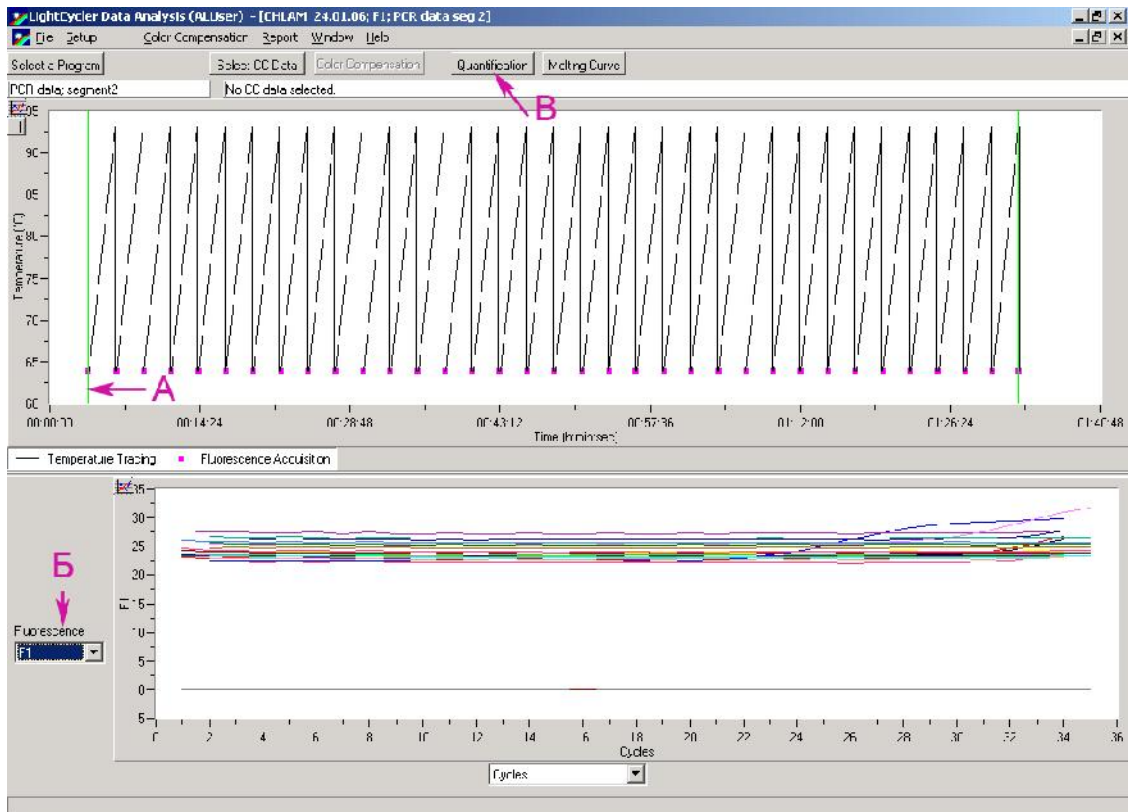


Рис.12

6.2.8. В открывшемся окне (рис. 13) выбрать параметры анализа для подсчета: Метод анализа (Analysis) – Fit Points (A); установка базовой линии (Baseline Adjustment) – Arithmetic (Б).

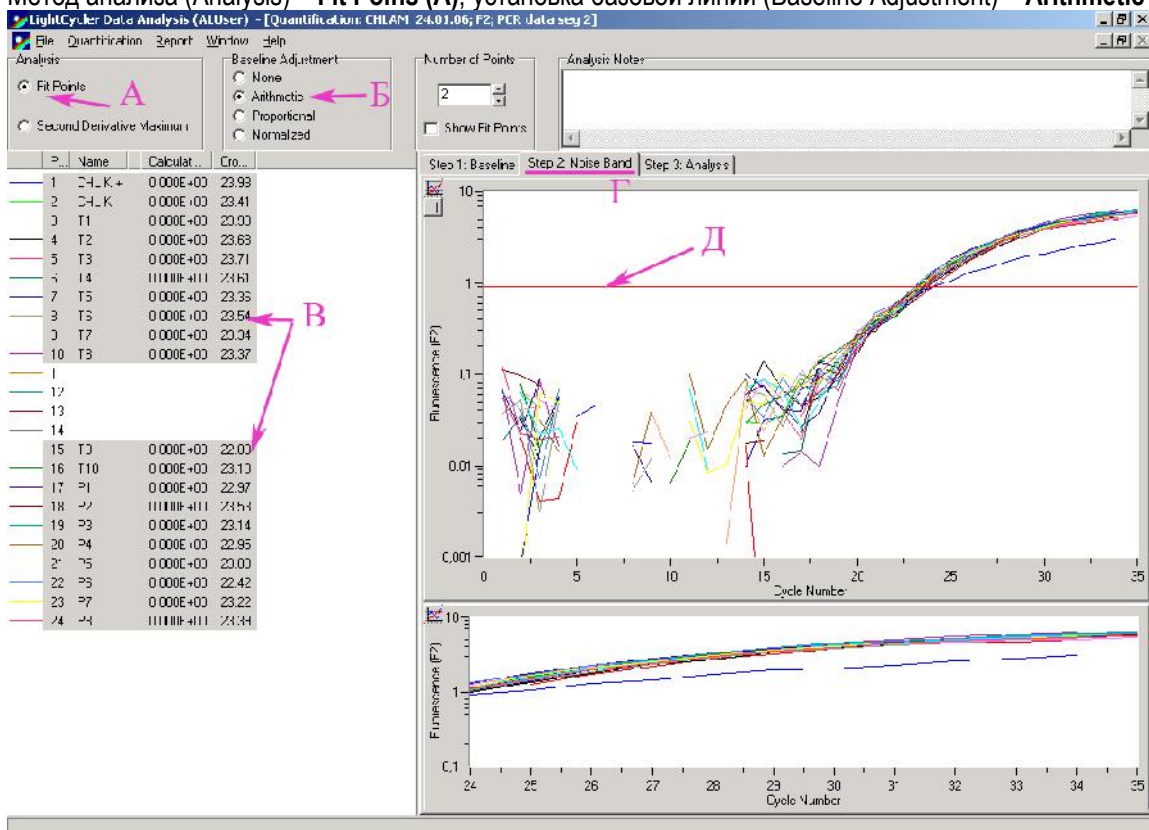


Рис. 13

В левой колонке выделить все анализируемые ячейки (B).

Примечание. Если при проведении количественного анализа в штативе находятся пробирки, относящиеся к тестам на разных возбудителях, выделять пробы при анализе специфического сигнала (канал F1) следует только для 1 системы.

В правом окне с кривыми флуоресцентного сигнала выбрать вкладку Step 2: Noise Band (Г) и вручную установить на графике пороговую линию (Threshold) (Д) согласно таблице.

	Канал	Флуорофор	Начальный цикл	Конечный цикл	Threshold
Внутренний контроль	F2	HEX	8	36	2
<i>Bacteroides spp.</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Candida albicans</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Chlamydia trachomatis</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Cytomegalovirus</i> **	F1	FAM	8	36	0,6**
<i>Epstein-Barr virus</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Gardnerella vaginalis</i> *	F1	FAM	8	26*	1
<i>Herpes simplex virus 1</i> ***	F1	FAM	8	36	1
<i>Herpes simplex virus 1+2</i> ****	F1	FAM	8	36	1
<i>Herpes simplex virus 2</i> ***	F1	FAM	8	36	1
<i>Human papilloma virus 16</i> ***	F1	FAM	8	36	1
<i>Human papilloma virus 16+18</i> ****	F1	FAM	8	36	2
<i>Human papilloma virus 18</i> ***	F1	FAM	8	36	1
<i>Human papilloma virus 6+11</i> ****	F1	FAM	8	36	3
<i>Human papilloma virus 31+33</i> ****	F1	FAM	8	36	3
<i>Lactobacillus spp.</i> *	F1	FAM	8	26*	1
<i>Mobiluncus curtisii</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Mycoplasma genitalium</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Mycoplasma hominis</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Toxoplasma gondii</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Trichomonas vaginalis</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Ureaplasma parvum</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Ureaplasma spp.</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Ureaplasma urealyticum (T-960)</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Escherichia coli</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Proteus spp.</i>	F1	FAM	8	36	1,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Enterococcus faecalis, E. faecium</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Enterobacter spp., Klebsiella spp.</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Serratia spp.</i>	F1	FAM	8	36	1,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Streptococcus spp.</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Atopobium vaginae</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Listeria spp.</i>	F1	FAM	8	36	1
<i>Mycobacterium (tuberculosis+bovis)</i>	F1	FAM	8	36	1
Резистентность <i>Enterobacteriaceae</i> к цефалоспоридам	F1	FAM	8	36	1
Резистентность <i>Staphylococcus aureus</i> к цефалоспоридам	F1	FAM	8	36	1

* Только для специфического сигнала (канал F1)! Если в штативе помимо пробирок указанных наборов находятся пробирки других наборов, конечный цикл можно устанавливать равным 36, однако при интерпретации необходимо помнить, что для отмеченных возбудителей любые значения после 26 цикла следует считать отрицательными.

** Только для специфического сигнала (канал F1)! Если в штативе помимо пробирок указанных наборов находятся пробирки других наборов, следует выделять и выводить в отчет отдельно анализ на указанные и отдельно остальные тесты.

*** - Типоспецифичные наборы

**** - Наборы без дифференцировки типа.

6.2.9. Перейти на вкладку Step 3: Analysis (A). (Рис.14)

Проверить, чтобы в поле Number of Points (Б) стояло значение 2. В графе Crossing point в таблице в левой части окна появляются числовые значения (Б), отражающие накопление фрагмента внутреннего контроля. Если в графе нет числового значения, то в данном образце по выбранному для анализа каналу не зафиксировано пересечение кривой флуоресцентного сигнала образца с базовой линией, т.е. фрагмент ДНК не обнаружен. Если среди пробирок находились должным образом прописанные стандартные образцы, наряду с точками пересечения в графе Calculated Concentration для каждого образца, кривая которого пересекла пороговую линию, будет выведено численное значение концентрации.

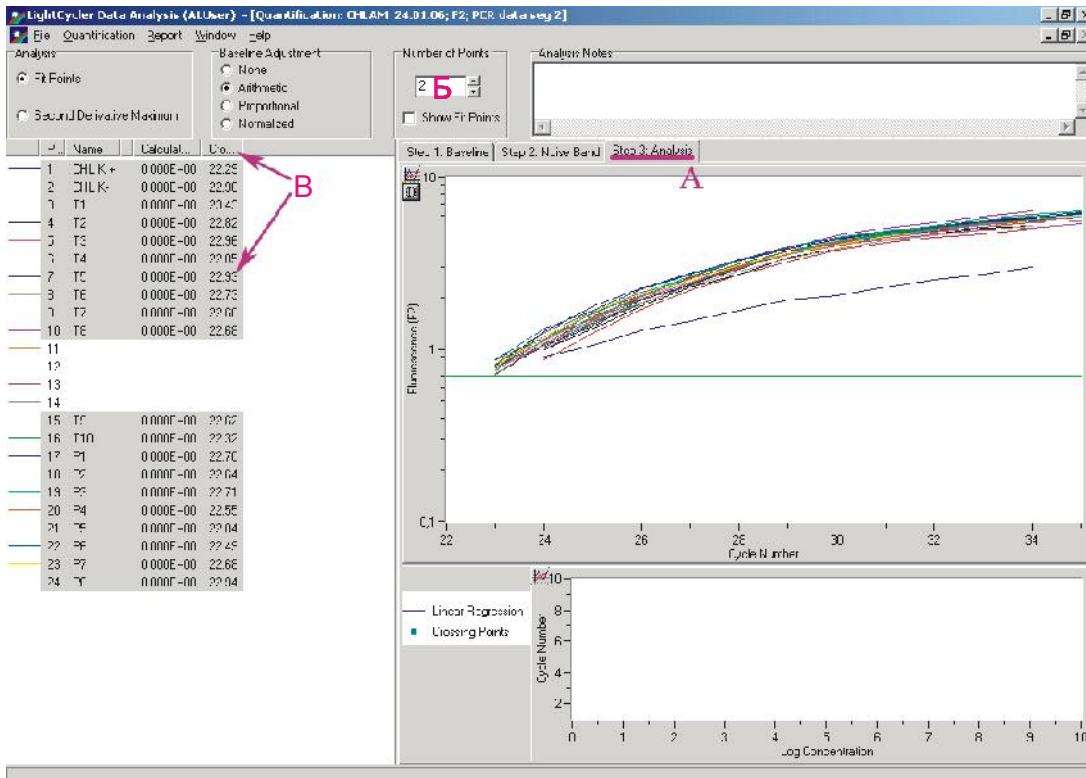


Рис. 14

6.2.10. Выбрать пункт Print Summary Report в меню Report (рис.15) и вывести отчет на печать. Отчет выводится отдельно по каждому каналу. В него включается информация обо всех лунках штатива с указанием, какие из них были отмечены.

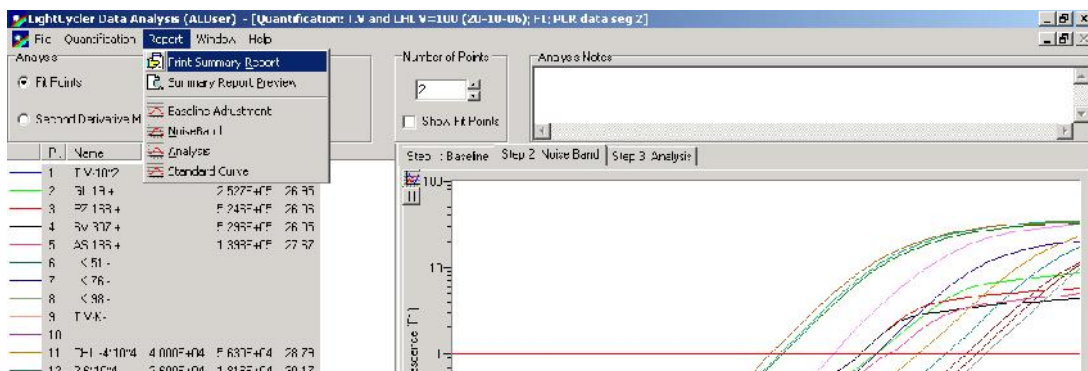


Рис.15

6.2.11. Выполнить п.п. 6.2.5. – 6.2.10. выбрав в качестве анализируемого канала F1 (флуорофор FAM).

6.3. Интерпретация результатов качественного анализа производится согласно таблице:

	Значение по каналу F1	Значение по каналу F2	Результат
К+	есть (для GV и Lac ≤25)	любой	Специфическая реакция прошла
	нет (для GV и Lac >25)	любой	Специфическая реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	есть (для GV и Lac ≤25)	есть	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
К-	нет (для GV и Lac >25)	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	есть (для GV и Lac ≤25)	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	нет (для GV и Lac >25)	есть	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
Анализируемый образец	есть (для GV и Lac ≤25)	любой	ПРИСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	нет (для GV и Lac >25)	есть	ОТСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	нет (для GV и Lac >25)	нет	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

6.4. Интерпретация результатов количественного анализа (чувствительность наборов см. в основной части инструкции):

	Значение по каналу F1	Значение по каналу F2	Результат
К+	≥ чувствит.	любой	Специфическая реакция прошла
	нет или < чувствит.	любой	Специфическая реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	≥ чувствит.	есть	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
К-	нет или < чувствит.	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	≥ чувствит.	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	нет или < чувствит.	есть	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ.
Анализируемый образец	≥ чувствит.	любой	ПРИСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	нет или < чувствит.	есть	ОТСУТСТВИЕ ДНК возбудителя.
	нет или < чувствит.	нет	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

Внимание! Надежными можно считать численные значения только для тех образцов, значения Ct для которых лежат между максимальным и минимальным значениями Ct для стандартных образцов!