УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 01.12.2009 № 9661-Пр/09

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.И. Покровский
«12» октября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

«АмплиСенс® *Toxoplasma gondii*-FL»

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОГЛАВЛЕНИЕ

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ. 3
СОСТАВ. 4
НАЗНАЧЕНИЕ. 6
ПРИНЦИП МЕТОДА. 7
ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ. 8
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ. 11
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА. 12
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА. 14
ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ. 14
ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ. 15
АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ. 17
ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ. 19
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ. 19
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ 20

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

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

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 1 варианте.

Вариант FRT

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

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

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

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СОСТАВ.

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

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

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

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

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

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций амплификации, включая контроли.
Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

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

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-200 F –

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Toxoplasma gondii* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» **включает:**

Реактив	***Описание***	***Объем (мл)***	***Кол-во***
ПЦР-смесь-1-FRT *Toxoplasma gondii*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	4 пробирки
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	4 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	2 пробирки
ПКО ДНК *Toxoplasma gondii* и STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	4 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки

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

Дополнительно к комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

НАЗНАЧЕНИЕ.

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

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

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИНЦИП МЕТОДА.

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

а) выделении тотальной ДНК из белых клеток периферической и пуповинной крови; спинномозговой жидкости, биопсийного и аутопсийного материала, амниотической жидкости совместно с ДНК экзогенного внутреннего контрольного образца;

б) одновременном проведении реакции амплификации (мультиплекс-ПЦР) участка ДНК неструктурного повторяющегося гена размером 529 п.н., кодирующего белок *Toxoplasma gondii* и искусственно сконструированного фрагмента ДНК, клонированного в ДНК фаг-λ, используемого в качестве **экзогенного неконкурентного** внутреннего контроля с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Для проведения анализа используется следующий материал:

– **цельная периферическая и пуповинная кровь**

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

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

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

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

– **биопсийный и аутопсийный материал**

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

0,3 мл транспортной среды.

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

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

– **спинномозговая жидкость**

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

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

– **амниотическая жидкость**

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

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

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

Для выделения ДНК рекомендуется использовать следующие

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

комплекты реагентов производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора:

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.
(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения ДНК из исследуемого материала требуются:

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

ЗОНА 2.

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

1. Амплификатор например, «Rotor-Gene» 3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «iQ5», «iQ iCycler» («BioRad», США) и «Mx3000P»/«Mx3005P» («Stratagene», США) или эквивалентный.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Для приборов с детекцией через дно пробирки (например, «Rotor-Gene»): одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, «Axygen», США) для постановки в ротор на 36 пробирок или 0,1 мл («Corbett Research», Австралия) для постановки в ротор на 72 пробирки.

   Для приборов с детекцией через крышку (например, «iQ5», «Mx3000P»): одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, «Axygen», США).
3. ПЦР-бокс (например, БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 100 и 200 мкл (например, «Axygen», США).
8. Штативы для наконечников (например, «Axygen», США) и микропробирок объемом 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
10. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
11. Емкость с дезинфицирующим раствором.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.
ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.
(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала).
Объем пробы, необходимый для выделения ДНК – 0,1 мл.
При использовании комплекта реагентов «РИБО-преп».
Порядок работы.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

12. Процентрифугировать при **13 тыс об/мин** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на **200 мкл** для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 2 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при **13 тыс об/мин в течение 1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (ДНК-проба). Указанный материал готов к постановке ПЦР.

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

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

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

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

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

Порядок работы:

А. Подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР.

1. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением эксперимента. Смешивать реагенты из расчета расходования на одну реакцию:
   - 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT *Toxoplasma gondii*
   - 5 мкл ПЦР-смеси-2-FRT
   - 0,5 мкл Полимеразы (TaqF)

Сделать расчет на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, можно

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

согласно расчетной таблице (см. приложение 1). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца ДНК необходимо проводить постановку двух контрольных точек этапа амплификации ПЦР: положительного и отрицательного контролей ПЦР.

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

Б. Проведение амплификации.

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

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов роторного типа[1]

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

Программа амплификации «АмплиСенс-1» для приборов планшетного типа[2]

[1] Например, RotorGene 3000 и RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия)
[2] Например, iQiCycler, iQ5 (BioRad, США), Mx3000P (Stratagene, США)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

3. По окончании выполнения программы приступить к учету результатов.

АНАЛИЗ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

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

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

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

Результат амплификации по каналу считается *положительным*, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в реальном времени S-образный вид, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуореценции, и значение порогового цикла (Ct или Cp) для канала FAM/Green менее 30, а для канала JOE/Yellow/HEX менее 40, *отрицательным* в случае отсутствия кривой типичной формы и пересечения с пороговой линией (нет значения Ct или Cp), *сомнительным* во всех других случаях.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Возможные ошибки.

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники и т.п.), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20–24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности: 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

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

Хранение. Комплект реагентов «РИБО-преп», «ПЦР-комплект» (кроме ПЦР-смеси-1-FRT *Toxoplasma gondii*, ПЦР-смеси-2-FRT и полимеразы (TaqF)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FRT *Toxoplasma gondii*, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

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

Заведующий НПЛ ОМДиЭ

ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ 1
СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РЕАКЦИОННЫХ СМЕСЕЙ

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

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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru