

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач

Г.У. «Республиканский центр гигиены,
эпидемиологии и общественного
здоровья»

А.Л. Скуранович

2024 г.



НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ
CHLAMYDIA TRACHOMATIS
«*Chlamydia trachomatis*-ПЦР/РВ»

инструкция по применению

Минск 2024

Набор реагентов для генодиагностики *Chlamydia trachomatis* «*Chlamydia trachomatis*-ПЦР/PВ» (далее по тексту – набор реагентов) предназначен для выявления ДНК возбудителя урогенитального хламидиоза в биологическом материале (соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, отделяемого конъюнктивы глаз, моча, секрет предстательной железы и эякулят человека, инфицированная культура клеток) методом ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

Принцип действия набора реагентов основан на специфическом взаимодействии олигонуклеотидов (праймеров) и гибридизационной пробы с нуклеотидной последовательностью диагностически значимых участков генома *Chlamydia trachomatis*. Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналам для флуорофоров ROX (ДНК *Chlamydia trachomatis*) и FAM (ДНК ВКО).

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов предназначен для проведения ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с целью выявления ДНК *Chlamydia trachomatis* в биологических образцах по технологии TaqMan (с использованием гибридизационно-флуоресцентных зондов).

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 исследований, включая контроли.

Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2 СОСТАВ

Набор реагентов содержит следующие компоненты:

– ПЦР-смесь	4 фл.
– Таq-ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	1 фл.
– Положительный контрольный образец – K ⁺ ПЦР	1 фл.
– Отрицательный контрольный образец – K ⁻ ПЦР	1 фл.
– Внутренний контрольный образец – ВКО	4 фл.
– Инструкция по применению	1 шт.

3 СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Меры предосторожности

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования (ПЦР) клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением «Требований безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки».

Работа проводится только в одноразовых перчатках, используются одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) обеззараживается 3-5% раствором перекиси водорода в специальных контейнерах, после чего разрешается слив в общую канализационную сеть.

Постановку ПЦР осуществляют в 3 рабочих зонах. Зона 1 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – выделение ДНК из проб биологического материала. Зона 2 (ламинарный бокс, бокс с УФ-лампой) – подготовка проб и контролей, внесение проб в микропробирки с ПЦР-реагентами. Зона 3 – проведение амплификации. Пробы из зоны 3 запрещается переносить в зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей.

При утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР после амплификации, недопустимо их открывание и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами амплификации лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

Перчатки и халаты меняют при переходе из одной зоны в другую. Поверхности столов, а также помещения, где проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом.

Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

Не использовать набор по истечении срока годности.

4 МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЮЩИЕСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО

4.1 Набор реагентов для выделения ДНК из биологического материала (набор реагентов «НК экстра» или аналоги, соответствующие типу биологического образца);

4.2 Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, IQ 5, CFX96 (Bio-Rad, США), Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q (Corbett Research, Австралия), ДТ96 (ДНК-технология, РФ)).

4.3 Настольный бокс с бактерицидной лампой (например, «Biosom» или любой другой марки) либо стерильный ламинарный шкаф (например, Kojair KR-125 Safety или любой другой марки).

4.4 Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф», поддерживающий температуру 25–100 °С (например, «Biosom» или любой другой марки).

4.5 Центрифуга-вортекс (любой марки).

4.6 Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин (любой марки).

4.7 Вакуумный аспиратор с колбой-ловушкой (любой марки).

4.8 Набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», «Socorex» либо любой другой марки).

4.9 Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 200 мкл и до 1000 мкл.

4.10 Пробирки, свободные от ДНКаз, типа «Эппендорф» на 1,5 мл и на 0,2 мл (в соответствии с требованиями к используемому амплификатору с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»).

4.11 Штативы для наконечников, микропробирок (любой марки).

4.12 Холодильник на 2 – 8 °С, морозильник на минус 20°С (любой марки).

4.13 Пакеты для сбора и утилизации медицинских отходов.

5 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Для исследования используется биологический материал – соскобное отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, прямой кишки, ротоглотки, отделяемого конъюнктивы глаз, моча, секрет предстательной железы и эякулят человека, инфицированная культура клеток.

Материал доставляется в лабораторию и хранится до начала исследования при 2-8 °С не более 24 часов. Допускается хранение замороженного материала при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение одного месяца.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов, во избежание кросс-контаминации, используются только одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

5.1 Выделение генетического материала

Выделение ДНК проводится в зоне 1 с использованием набора для выделения ДНК согласно инструкции производителя.

Внимание: набор реагентов укомплектован внутренним контрольным образцом (ВКО), который вносится в объеме 10 мкл в каждую исследуемую пробу до начала процедуры выделения ДНК для контроля этапа выделения генетического материала.

Полученную в результате выделения ДНК используют для постановки ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени.

Оставшуюся ДНК при необходимости хранят при – 20 °С.

5.2 Постановка ПЦР

Постановка ПЦР проводится в зоне 2.

Выбор пробирок (стрипов, плашек) для амплификации зависит от вида используемого амплификатора с системой детекции продуктов реакции в режиме реального времени.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используют одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

В штатив ставят необходимое количество пустых пробирок (стрипов) объемом 0,2 мл (из расчета $n+2$ пробирок, где n – количество анализируемых образцов, две дополнительные пробирки предназначены для анализа K^+ ПЦР и K^- ПЦР).

Размораживают и тщательно перемешивают на вортексе ПЦР-смесь, осаждают капли с крышек пробирок.

Смешивают в чистой охлажденной пробирке реагенты из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, согласно таблице 1.

Таблица 1 – Приготовление реакционной смеси

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	40,0	0,4
Число реакций*	ПЦР-смесь	Тaq-ДНК-полимераза
6	240	2,4
8	320	3,2
10	400	4,0
12	480	4,8

* при проведении исследования более чем 10 образцов объем ПЦР-смеси следует рассчитывать исходя из числа реакций с добавлением одного дополнительного образца

Вносят приготовленную реакционную смесь по 40 мкл в пробирки для амплификации, промаркированные соответствующим образом.

Вносят ДНК исследуемых проб по 10 мкл в пробирки с реакционной смесью.

Вносят 10 мкл K^- ПЦР в одну пробирку с реакционной смесью.

Вносят 10 мкл K^+ ПЦР в одну пробирку с реакционной смесью.

Пробирки закрывают, содержимое осаждают на вортекс-центрифуге в течение 3-5 секунд.

Пробирки переносят в термоциклер с оптическим модулем, программируют прибор (с учетом рекомендаций по калибровке) для выполнения соответствующей программы амплификации (таблица 2) и детекции флуоресцентного сигнала по каналам ROX и FAM.

Таблица 2 – Режим амплификации

№	Сегмент цикла	Температура	Время	Количество циклов
1	Денатурация	95 ⁰ С	3 минуты	1
2	Денатурация Отжиг (детекция флуоресцентного сигнала*) Элонгация	95 ⁰ С 58 ⁰ С 72 ⁰ С	20 сек 20 сек 20 сек	45

* детекция флуоресцентного сигнала осуществляется по каналам для флуорофоров ROX (ДНК *Chlamydia trachomatis*) и FAM (ДНК ВКО).

5.3 Регистрация и оценка результатов реакции

Учет результатов реакции осуществляют в зоне 3.

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу соответствующего флуорофора для регистрации накопления продуктов амплификации гена-мишени. Учёт результатов проводят отдельно по каждому каналу.

Для анализа результатов по выбранному каналу следует установить необходимые опции обработки данных в соответствии с описанием для используемого прибора (таблица 4).

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или, соответственно, отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла C_t .

Результат амплификации по каналу оценивается как положительный, если кривая однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, при этом значение порогового цикла C_t не превышает граничного ($C_t < 40$); как отрицательный, если значение порогового цикла C_t отсутствует или превышает граничное ($C_t > 40$).

Граничные значения порогового цикла C_t указаны в таблице 3.

Учет результатов следует начинать с анализа результатов амплификации положительного (К⁺ПЦР), отрицательного (К⁻ПЦР) и внутреннего (ВКО) контрольных образцов. Примеры для анализа результатов для приборов роторного и плншетного типов представлены в таблице 4.

Результаты анализа не учитываются, если:

- во время прохождения реакции в пробирке с положительным контрольным образцом не регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам ROX и FAM, значения порогового цикла C_t не определены или превышают граничные ($C_t > 40$). В данной ситуации необходимо повторное исследование всех образцов;

- в пробирке с отрицательным контрольным образцом регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам ROX и FAM, при этом определены значения порогового цикла C_t , не превышающие граничные ($C_t < 40$). Это свидетельствует о наличии контаминации. Необходимо принять меры для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и провести повторное исследование всех образцов;

- в исследуемой пробе, содержащей ВКО, не регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM, значение порогового цикла C_t отсутствует

или превышает граничное ($Ct > 40$). Это свидетельствует о неудовлетворительном качестве выделения ДНК. В такой ситуации необходим повторный анализ данного образца.

В случае, если получен аналогичный результат для повторного анализа невалидных или сомнительных образцов, рекомендуется повторить все этапы, начиная с выделения нуклеиновых кислот и/или забора биологического материала.

Результаты анализа *учитываются*, если:

- во время прохождения реакции в пробирках с положительным контрольным образцом регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналам ROX и FAM, при этом значения порогового цикла Ct для не превышают граничного значения ($Ct < 40$);

- во время прохождения амплификации не регистрируется флуоресцентный сигнал по каналам ROX и FAM в пробирке с отрицательным контрольным образцом; значения порогового цикла Ct отсутствуют или превышают граничные значения ($Ct > 40$). указанные во вкладыше к набору;

- в исследуемой пробе регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM (ДНК ВКО), при этом значение порогового цикла Ct не превышает граничного значения ($Ct < 40$).

Принцип интерпретации результатов следующий:

Образец считается положительным на наличие ДНК *Chlamydia trachomatis*, если по каналу ROX получено значение порогового цикла Ct , не превышающее граничное значение ($Ct < 40$). При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

Образец считается отрицательным на наличие ДНК *Chlamydia trachomatis*, если по каналу ROX значение порогового цикла не определено или превышает граничное значение $Ct > 40$.

Образец считается сомнительным на наличие ДНК *Chlamydia trachomatis*, если по каналу ROX получено значение порогового цикла Ct , равное граничному значению ($Ct = 40$). В данном случае рекомендуется повторный анализ данного образца.

Таблица 3 – Учет и анализ результатов ПЦР-исследования образцов

	Результат положительный	Результат отрицательный	Результат сомнительный	Результат невалидный
ДНК <i>Chlamydia trachomatis</i> Значение « Ct » по каналу «ROX»	$Ct < 40$	Значение не определено, или $Ct > 40$	$Ct = 40$	Значение не определено, или $Ct > 40$
ДНК ВКО Значение « Ct » по каналу «FAM»	$Ct < 40$	$Ct < 40$	$Ct < 40$ или $Ct = 40$	Значение не определено, или $Ct > 40$

Таблица 4 – Параметры для анализа результатов для приборов роторного и планшетного типов

	Приборы роторного типа (Rotor-Gene 3000/6000, Rotor-Gene Q)	Приборы планшетного типа (IQ 5, CFX96, ДТ96)
Порог/Threshold	FAM = 0,1 ROX = 0,1	На уровне 10-20% от максимального уровня флуоресценции, полученного для «К+» для FAM и ROX
More settings/ Outlier Removal/ Устранение выбросов	FAM = 5% ROX = 5%	-
Slope Correct/ Корректировка уклона	FAM = выключена ROX = выключена	-

6 ФОРМА ВЫПУСКА

Набор реагентов «*Chlamydia trachomatis*-ПЦР/РВ» выпускается в виде упакованного набора. Набор рассчитан на проведение 96 исследований, включая контроли.

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

Транспортировка набора реагентов должна производиться при температуре от +2 до +8°C в течение суток.

Хранение набора реагентов должно производиться при температуре $(-20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ на протяжении всего срока годности.