

ООО АЛЬФАЛАБ

Рабочая инструкция

к набору реагентов для обнаружения ДНК
возбудителей протозойных инфекций
(*Lamblia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba
fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*)
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)
в образцах биоматериала человека
«Прото-скрин»

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2015/2769

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Прото-скрин» предназначен для качественного обнаружения ДНК возбудителей протозойных инвазий (*Lambliа Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*) в клинических образцах методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР).

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

Материалом для исследования являются фекальные образцы.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Анализ образцов включает следующие этапы:

1. Пробоподготовка (выделение ДНК из образцов клинического материала);
2. Амплификация специфических фрагментов ДНК в ходе ПЦР-реакции с детекцией в режиме реального времени;

Для выявления ДНК простейших в исследуемых образцах используются специфические олигонуклеотиды и флуоресцентно меченные олигонуклеотидные зонды Taqman. В процессе ПЦР-реакции в присутствии фермента Taq-полимеразы происходит гибридизация олигонуклеотидов и зонда с комплементарным участком ДНК-мишени. Образование специфического продукта амплификации происходит только при наличии выявляемого возбудителя в исходном клиническом материале и сопровождается отщеплением флуоресцентной метки (благодаря наличию у Taq-полимеразы 5'-экзонуклеазной активности) и появлением детектируемого флуоресцентного сигнала, регистрация которого проводится в режиме реального времени. Интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству специфических продуктов амплификации и, следовательно, нарастает с каждым последующим циклом.

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

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

2.2. ФОРМА ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов «Прото-скрин» рассчитан на проведение анализа 50 образцов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы.

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

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

2.3. СОСТАВ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Таблица 1

Компонент набора	Назначение	Количество	
		раскапанный вариант	нераскапанный вариант
<u>Смеси для амплификации:</u>			
		раскапанный вариант	нераскапанный вариант
ПЦР-смесь «Lamb»	Смесь для обнаружения ДНК <i>Lambliа Intestinalis</i> <i>Giardia</i>	50 пробирок (0,2 мл), по 10 мкл, запечатанные воском	1 пробирка (1,5 мл), 520 мкл
ПЦР-смесь «Bh»	Смесь для обнаружения ДНК <i>Blastocystis hominis</i>	50 пробирок (0,2 мл), по 10 мкл, запечатанные воском	1 пробирка (1,5 мл), 520 мкл
ПЦР-смесь «AmFr/IsoB»	Смесь для обнаружения ДНК <i>Dientamoeba fragilis/ Isospora belli</i>	50 пробирок (0,2 мл), по 10 мкл, запечатанные воском	1 пробирка (1,5 мл), 520 мкл
ПЦР-смесь «Cr/EnHi»	Смесь для обнаружения ДНК <i>Cryptosporidium parvum/Entamoeba histolytica</i>	50 пробирок (0,2 мл), по 10 мкл, запечатанные воском	1 пробирка (1,5 мл), 520 мкл
ПЦР-смесь «BK»	Смесь для проверки качества выделения ДНК	50 пробирок (0,2 мл), по 10 мкл, запечатанные воском	1 пробирка (1,5 мл), 520 мкл
Раствор Taq-полимеразы		5 пробирок по 520 мкл	
Комплект положительных контрольных образцов (ПКО «Lamb», ПКО «Bh», ПКО «AmFr/«IsoB», ПКО «Cr/ EnHi», ПКО «BK»)		5 пробирок по 30 мкл	
Отрицательный контрольный образец (ОКО)		1 пробирка (150 мкл)	

К каждому набору реагентов прилагается Рабочая инструкция (1 шт) и паспорт набора реагентов (1 шт).

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ России от 06.06.2012 № 4н).

3.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

3.3. Меры предосторожности – соблюдение правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

3.4. Утилизация отходов производится в соответствии с СанПиН N2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», сбор отходов осуществляется в одноразовые пакеты желтого цвета, предназначенные для утилизации медицинских отходов класса Б.

4. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1-й этап – выделение ДНК из клинического материала

ВНИМАНИЕ! Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала не входит в состав набора

Для выделения ДНК из клинических образцов используются наборы реагентов, рекомендованные для использования в клинической лабораторной диагностике для выделения ДНК из фекалий. Использование для выделения ДНК экспресс-методов экстракции допускается только при условии дополнительной очистки¹.

Необходимое оборудование:

- ламинарный бокс 2-го класса защиты;
- центрифуга для пробирок вместимостью 1,5 мл на 3000 – 12000 об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- твердотельный термостат для пробирок вместимостью 1,5 мл типа Термит (ООО НПФ «ДНК-технология», Россия), поддерживающий температуру до + 99°C;
- пипетки-дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 5-50; 20-200; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5 – 10; 20-200 мкл;

¹ Протокол модифицированной процедуры выделения ДНК с использованием экспресс-методов предоставляется по запросу

- емкость для дезинфицирующего раствора для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующий раствор;
- отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки резиновые или пластиковые, одноразовые по МУ 1.3.2569-09.

2-й этап - проведение ПЦР-амплификации и детекция продуктов амплификации в режиме реального времени с помощью набора реагентов «Прото-скрин»

Необходимое оборудование:

- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- штатив «рабочее место» для стрипованных и обычных пробирок объемом 0,2 мл;
- микроцентрифуга-вортекс на 1500 – 3000 об/мин;
- пипетки-дозаторы переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5-50; 20-200;
- одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром 0,5 – 10; 20-200 мкл;
- пробирки для ПЦР-РВ объемом 0,2 мл (для нераскапанного варианта комплектации набора реагентов);
- холодильник с морозильной камерой для хранения исходных реагентов;
- отдельный халат, шапочки, обувь и перчатки резиновые или пластиковые, одноразовые по МУ 1.3.2569-09;
- емкость для дезинфицирующего раствора для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- дезинфицирующий раствор;
- термостат программируемый (амплификатор) для проведения ПЦР с детекцией флуоресценции по каналу FAM в режиме «реального времени».

5. ПРОБОПОДГОТОВКА

5.1. Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала должно проводиться в строгом соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, 2012 г.

Для исследования используются фекальные образцы. Контейнер с материалом доставляется в лабораторию и хранится до начала исследования при 2-8 °С. Время от

взятия материала до начала исследования не должно превышать 24 часов. При необходимости более длительного хранения материал помещают в морозильную камеру и хранят при температуре не выше минус 18 °С.

5.2. Рекомендации по выделению ДНК из фекальных образцов

ДНК желательно выделять из жидкого материала. Если образец твердый (кал), небольшое количество материала (не более 100 мг) ресуспендировать в транспортной среде или физиологическом растворе.



При выделении ДНК из твердого материала небольшое количество образца необходимо перенести непосредственно в пробирку с лизирующим раствором (примерное количество вносимого образца показано на рисунке - на кончике наконечника дозатора).

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

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Общий объём реакционной смеси – 25 мкл, включая объём пробы ДНК – 5 мкл.

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с аэрозольным барьером!

6.1. Подготовка к проведению ПЦР (раскапанный вариант)

6.1.1. В штатив поставить необходимое количество пробирок со смесью для амплификации (из расчета $n + 2$ пробирок каждой специфичности, где n – количество анализируемых образцов, две дополнительные пробирки предназначены для анализа ПКО и ОКО;

6.1.2. В каждую пробирку внести по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы (не повреждая слой воска), закрыть пробирки. Пробирки готовы к внесению образцов ДНК, ПКО и ОКО.

6.2. Подготовка к проведению ПЦР (нераскапанный вариант)

6.2.1. В штатив поставить необходимое количество пустых пробирок объемом 0,2 мл (из расчета $n + 2$ пробирок каждой специфичности, где n – количество анализируемых образцов, две дополнительные пробирки предназначены для анализа ПКО и ОКО;

- 6.2.2. Тщательно перемешать все смеси для амплификации (ПЦР-смесь «Lamb», ПЦР-смесь «Vh», ПЦР-смесь «AmFr/IsoB», ПЦР-смесь «Sp/EnHi», ПЦР-смесь «BK»), а затем осадить капли на вортексе;
- 6.2.3. В подготовленные пробирки внести по 10 мкл соответствующей амплификационной смеси;
- 6.2.4. В каждую пробирку внести по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы.
- 6.2.5. В каждую пробирку добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл), закрыть пробирки. Пробирки готовы к внесению образцов ДНК, ПКО и ОКО.

6.3. Проведение ПЦР (аналогично для раскапанного и нераскапанного вариантов)

- 6.3.1. Поочередно открывая крышки пробирок внести в пробирки:
- В одну из подготовленных пробирок - 5 мкл ОКО;
 - В пробирки, предназначенные для анализа образцов - по 5 мкл анализируемых проб;
 - В оставшуюся пробирку - 5 мкл ПКО.
- 6.3.2. Установить все пробирки в блок детектирующего амплификатора;
- 6.3.3. Запустить программу амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 2.

Внимание! Для ПЦР-смесей «AmFr/IsoB» и «Sp/EnHi» регистрация осуществляется по двум каналам флуоресценции (FAM и HEX)!

Регистрация флуоресцентного сигнала по каналу FAM: *Lambliа Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Cryptosporidium parvum*

Регистрация флуоресцентного сигнала по каналу HEX: *Isospora belli*, *Entamoeba histolytica*

РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Детекция продуктов амплификации проводится в режиме реального времени с использованием детектирующего ПЦР-амплификатора согласно инструкции к прибору. Для обнаружения ДНК *Lambliа Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Cryptosporidium parvum*, а также бактериальной ДНК (используется в качестве внутреннего контроля качества выделения ДНК из фекальных образцов) необходимо

использовать канал **FAM**. Для обнаружения ДНК *Isospora belli* и *Entamoeba histolytica* необходимо использовать канал **HEX**.

Таблица 2. Программа амплификации

Режим амплификации для прибора MiniOpticon, BioRad		
Температура	Время	Количество циклов
94°C	5 мин	1
94°C	5 сек	40
58°C	6 сек *	
72°C	10 сек	
10°C - хранение		
Режим амплификации для прибора ДТ96, ДНК технология		
Температура	Время	Количество циклов
94°C	5 мин	1
94°C	10 сек	40
58°C	10 сек *	
72°C	10 сек	
10°C - хранение		

* - детекция флуоресцентного сигнала

6.5. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

6.5.1. Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла *C_t*. Анализируемая проба считается положительной, если:

- график нарастания флуоресценции имеет форму экспоненциальной кривой;
- для пробы определено значение порогового цикла *C_t*;
- кривая флуоресценции пересекает пороговую линию на участке экспоненциального роста.

6.5.2. Принцип интерпретации:

6.5.2.1. Учет результатов следует начинать с результатов амплификации положительного (ПКО) и отрицательного контрольных (ОКО) образцов.

6.5.2.2. Результаты анализа не учитываются, если:

- Во время прохождения реакции детектирующий амплификатор **не регистрирует** экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM

или HEX в пробирке/ах с положительным контрольным образцом; **в данной ситуации необходимо повторное исследование всех образцов с использованием ПЦР-смеси, положительный контроль для которой не прошел;**

- В пробирке с ОКО регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM или HEX. **Необходимо принятие мер для устранения контаминации в ПЦР-лаборатории и повторное исследование всех образцов.**

- В исследуемой пробе в пробирке с ВК не регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции или значение порогового цикла C_t превышает допустимое значение, указанное в паспорте набора; это свидетельствует о неудовлетворительном качестве выделения ДНК; **в этой ситуации необходим повторный анализ данного образца, начиная со стадии выделения ДНК. При повторении результата делается вывод о плохом качестве взятия или хранения клинического материала, образец должен быть взят повторно.**

6.5.2.3. Результаты анализа учитываются, если:

- Во время прохождения реакции регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу FAM или HEX в пробирке с положительным контрольным образцом; и значение пороговых циклов C_t для каждого из ПКО не превышает допустимых значений, указанных в паспорте набора;

- Во время прохождения амплификации отсутствует флуоресцентный сигнал по каналу FAM или HEX в пробирке с ОКО; величина порогового цикла C_t для ПЦР-смеси «ВК» не превышает допустимого значения, указанного в паспорте набора;

- В исследуемой пробе регистрируется экспоненциальный рост уровня флуоресценции в пробирке с ВК и значение порогового цикла C_t не превышает допустимого значения, указанного в паспорте набора.

6.5.2.4. При соблюдении этих п. 6.5.2.2 и 6.5.2.3

- Образец **положителен** на наличие ДНК возбудителей протозойных инвазий (*Lambliia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*), если для данной пробы определено значение порогового цикла, причем кривая флуоресценции данной пробы должна пересекать пороговую линию на участке экспоненциального роста флуоресценции (таблица 3).

- Образец **отрицателен** на наличие ДНК возбудителей протозойных инвазий (*Lamblia Intestinalis*, *Giardia*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*), если для данной пробы отсутствует (не определяется) значение порогового цикла (кривая флуоресценции данной пробы не пересекает пороговую линию) (таблица 3).

Таблица 3. Принцип интерпретации результатов анализа

	Наличие флуоресценции			
	по каналу FAM		по каналу HEX	
	Образец положителен на наличие ДНК возбудителей протозойных инвазий	Образец отрицателен на наличие ДНК возбудителей протозойных инвазий	Образец положителен на наличие ДНК возбудителей протозойных инвазий	Образец отрицателен на наличие ДНК возбудителей протозойных инвазий
	<i>Lamblia Intestinalis</i> <i>Giardia</i>			
ПЦР-смесь «Lamb»	+	-		
ПКО «Lamb»	+	+		
ОКО	-	-		
ПЦР-смесь «BK»	+	+		
	<i>Blastocystis hominis</i>			
ПЦР-смесь «Bh»	+	-		
ПКО «Bh»	+	+		
ОКО	-	-		
ПЦР-смесь «BK»	+	+		
	<i>Dientamoeba fragilis</i>		<i>Isospora belli</i>	
ПЦР-смесь «AmFr/IsoB»	+	-	+	-
ПКО «AmFr/IsoB»	+	+	+	+
ОКО	-	-	-	-
ПЦР-смесь «BK»	+	+		
	<i>Cryptosporidium parvum</i>		<i>Entamoeba histolytica</i>	
ПЦР-смесь «Cr/EnHi»	+	-	+	-
ПКО «Cr/EnHi»	+	+	+	+
ОКО	-	-	-	-
ПЦР-смесь «BK»	+	+		

7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ НАБОРА

- 7.1. Срок годности набора реагентов – 6 месяцев с даты изготовления.
- 7.2. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.
- 7.3. Условия хранения набора реагентов «Прото-скрин» и его отдельных компонентов указаны на упаковке. Пробирки со смесями для амплификации необходимо хранить в

защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С. Раствор Таq-полимеразы, ПКО и ОКО необходимо хранить при температуре от 2 до 8 °С.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ООО «Альфалаб», 197376, Санкт Петербург, ул. Академика Павлова 14а, info@alphalabs.ru