



**ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ
ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК *UREAPLASMA UREALYTICUM*,
CHLAMYDIA TRACHOMATIS ТА *MYCOPLASMA GENITALIUM*
МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ**

«УСМ-ПЛР»

НОМЕР ЗА КАТАЛОГОМ **REF** **K656**



На 96 визначень



Для *in vitro* діагностики



ТОВ «ХЕМА» 03179 м.Київ, а/с 49
вул. Академіка Єфремова, 23
+38 (044) 422-62-16
clients@xema.com.ua
www.xema.in.ua



ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	2
3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СКЛАД	3
5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	4
6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	4
7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ	5
9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	6
10. КОНТРОЛЬ ПРОХОДЖЕННЯ РЕАКЦІЇ	7
11. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	7

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК *UREAPLASMA UREALYTICUM*, *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* ТА *MYCOPLASMA GENITALIUM* МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ «УСМ-ПЛР»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «УСМ-ПЛР» призначений для якісного виявлення ДНК *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis* та *Mycoplasma genitalium* методом ПЛР у реальному часі в препаратах нуклеїнових кислот (НК), виділених з клінічних зразків (зішкрібку з поверхні уретри, цервікального каналу, піхви).

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Принцип дії набору реагентів «УСМ-ПЛР» полягає в проведенні моноплексної ПЛР у реальному часі з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією. Метод полягає у багаторазовому подвоєнні специфічної ділянки ДНК за допомогою ДНК полімерази *in vitro*. У результаті утворюються копії ДНК, в кількості необхідній для достовірного визначення результату. У ході реакції копіюється тільки задана ділянка ДНК, яка задовольняє умови специфічності, що визначаються послідовністю праймерів і флуоресцентного зонда, і лише в тому випадку, якщо вона присутня у досліджуваному зразку.

Гібридизаційний зонд містить одночасно в своїй структурі флуорофор та гасник флуоресценції. У разі позитивної реакції гібридизаційний зонд відпалюється на копіях заданої ділянки ДНК і руйнується полімеразою, що супроводжується відділенням флуорофору від гасника, при цьому флуоресценція суміші зростає. Флуоресценція вимірюється ампліфікатором у режимі реального часу. До складу ДНК-зондів, що використовується для детекції продуктів ампліфікації фрагментів геномів *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis* та *Mycoplasma genitalium* включені флуоресцентні мітки FAM/Green, ROX/Orange та Cy5/Red.

Необхідною умовою якісного аналізу наявності цільових організмів в клінічних зразках є правильна техніка відбору зразка, вибір правильних транспортних пробірок, коректний режим транспортування, зберігання і т.д.

Показником правильного відбору біоматеріалу є достатня кількість геномної ДНК людини в пробі, яка контролюється показником КБ (контроль біоматеріалу). Джерелом цієї ДНК є епітеліальні клітини, що потрапляють у пробу при правильній техніці відбору біоматеріалу. До складу ДНК-зонда, що використовується для детекції продукту ампліфікації КБ, входить флуоресцентна мітка HEX/Yellow.

Виявлення вірусу в досліджуваних зразках складається з двох етапів:

- 1) екстракція ДНК;
 - 2) ампліфікація специфічних ділянок ДНК методом ПЛР у реальному часі.
- Інтерпретація результату проходить у два етапи:
- 1) оцінка біоматеріалу (КБ) - достовірно/недостовірно;
 - 2) реєстрація результатів - знайдено/не знайдено.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналітична чутливість.

Аналітична чутливість набору складає 1×10^3 *копій/мл (копій специфічної ДНК мішені на 1 мл біологічного зразка) для наступних видів клінічного матеріалу: зішкріби з поверхні уретри, цервікального каналу, піхви.

Діагностична чутливість набору складає не менше 98%.

3.2 Специфічність.

Були відсутні неспецифічні реакції при тестуванні зразків ДНК людини і панелі зразків ДНК наступних мікроорганізмів: *Chlamydia pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii*, *Ureaplasma parvum*, HSV 1 і 2 типу, HPV (типи 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59).

Діагностична специфічність набору складає не менше 98%.

* З наборами для виділення від інших виробників чутливість може відрізнятися.

4. СКЛАД

Форма випуску 1 розрахована на проведення 96 тестів. Набір може бути використаний для ручної та автоматичної методики постановки реакцій ПЛР.

	Компонент	Опис	Об'єм, мл	К-ть
1	Буфер УСМ	прозора рідина від безбарвного до рожевого кольору	1.5	1 шт
2	Полімераза	прозора безбарвна рідина	0.1	1 шт
3	ПКЗ УСМ*	прозора безбарвна рідина	0.3	1 шт
4	НКЗ**	прозора безбарвна рідина	0.5	1 шт
5	Інструкція з використання набору реагентів «УСМ-ПЛР»		-	1 шт
6	Паспорт контролю якості набору реагентів «УСМ-ПЛР»		-	1 шт

*ПКЗ УСМ – позитивний контрольний зразок набору «УСМ-ПЛР».

**НКЗ - негативний контрольний зразок.

УВАГА! Комплект реагентів для виділення ДНК з біологічного матеріалу не входить до складу набору «УСМ-ПЛР».

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

Роботу слід проводити в лабораторії, що виконує молекулярно-біологічні дослідження клінічного матеріалу методом ПЛР на присутність інфекційних захворювань, із дотриманням ДСанПіН 9.9.5-153-2008. Державні санітарні норми і правила «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I - IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» та «Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами» Наказ МОЗ України 08.06.2015 № 325.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- тонкостінні пробірки для ПЛР у реальному часі об'ємом 0.2 мл з опуклою або плоскою оптично-прозорою безбарвною кришкою, або пробірки об'ємом 0.2 мл в стріпах з прозорими кришками - при використанні приладу планшетного типу;
- тонкостінні пробірки для ПЛР об'ємом 0.2 мл з плоскою кришкою або пробірки для ПЛР до Rotor-Gene об'ємом 0.1 мл в стріпах по 4 шт. з кришками - при використанні приладу роторного типу;
 - штативи для пробірок об'ємом 0.2 мл або 0.1 мл;
 - пробірки, які щільно закриваються, об'ємом 1.5 мл для приготування реакційної суміші;
 - штативи для пробірок об'ємом 1.5 мл;
 - одноканальні дозатори змінного об'єму 1-20 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл;
 - одноразові наконечники з фільтром для для дозаторів змінного об'єму, з маркуванням «RNAase-free, DNAase-free» об'ємом 1-20 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000мкл;
 - ампліфікатор для проведення полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ДНК-Технологія), CFX- 96 (Bio-Rad, США); RotorGene 3000, 6000 (CorbettResearch, Австралія) і Rotor-GeneQ (QIAGEN, Німеччина) або інші ампліфікатори з аналогічними технічними характеристиками);
 - ламінарний бокс, клас біологічної безпеки II, тип А;
 - центрифуга-вортекс;
 - холодильник побутовий від 2 до 8 °С з морозильною камерою не вище мінус 16 °С;
 - засоби індивідуального захисту (одноразовий халат, шапочка, маска, взуття та рукавички);
 - ємність з кришкою для утилізації відходів.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Буфер УСМ перед проведенням дослідження необхідно довести до кімнатної температури (+18...+25 °С), ретельно перемішати і осадити краплі за допомогою центрифуги.

7.2. Полімераза необхідно дістати із морозильної камери безпосередньо перед використанням, ретельно перемішати і осадити краплі за допомогою центрифуги.

7.3. Приготувати реакційну суміш. Провести активацію необхідної кількості буферу УСМ шляхом додавання полімерази. Суміш готувати з розрахунку $n + 3$, де n - кількість зразків для аналізу, 3 - число додаткових пробірок. Додаткові пробірки необхідні для позитивного (ПКЗ УСМ), негативного контрольного зразка (НКЗ) і мінімального запасу на похибку піпетування (1 зразок). Приклад розрахунку необхідної кількості реагентів наведено в таблиці нижче. Після приготування реакційної суміші необхідно ретельно перемішати її за допомогою вортекса і осадити краплі з кришки пробірки.

Максимальна кількість пробірок	50	40	30	20	10
Буфер УСМ, мкл	750	600	450	300	150
Полімераза, мкл	50	40	30	20	10

Готову суміш зберігати при температурі +2...+8 °С не довше 8 годин.

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ

8.1. Набір реагентів «УСМ-ПЛР» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі - 16...-20 °С.

8.2. Готову суміш буфера та полімерази можна зберігати при температурі +2...+8 °С не довше восьми годин.

8.3. Якщо негайна постановка ампліфікації неможлива, допускається зберігання сумішей зразків ДНК з активованим буфером при температурі +2...+8 °С не довше двох годин.

8.4. Набори, що зберігалися з порушенням регламентованого режиму, застосуванню не підлягають.

8.5. Набір реагентів транспортувати критим транспортом (автомобільним, залізничним або повітряним) в термоконтейнерах, що містять холодоелементи при температурі +2...+25 °С не довше 5 діб.

8.6. Набори, транспортовані з порушенням температурного режиму, застосуванню не підлягають.

8.7. Для отримання надійних результатів необхідно суворе дотримання інструкції з використання набору.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

9.1. Поставити в штатив необхідну кількість пробірок або стрипів для ампліфікації ДНК досліджуваних і контрольних проб.

9.2. Внести 15 мкл активованого буфера в кожен пробірку.

9.3. У підготовлені пробірки з активованим буфером додати по 10 мкл ДНК-проб, що досліджуються, і негативний контрольний зразок (НКЗ), закрити всі кришки за винятком пробірки для ПКЗ UCM.

9.4. Додати у відповідну пробірку 10 мкл ПКЗ UCM, закрити кришку.

9.5. Встановити усі пробірки (стрипи) в блок ампліфікатора.

9.6. Запрограмувати ампліфікатор, відповідно до інструкції виробника приладу, і запустити відповідну програму ампліфікації (див. таблиці нижче).

Програма ампліфікації для приладів планшетного типу (ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96 (ДНК-Технологія), CFX-96 (Bio-Rad))

№ блоку	Температура, °C	хв	сек	Кількість циклів	Детекція	Тип блоку
1	95	15	00	1		цикл
2	94	0	30	5		цикл
	64	0	17		v	
3	94	0	10	40		цикл
	64	0	17		v	
4	30	-	-	зберігання		зберігання

Програма ампліфікації для приладів роторного типу (Rotor Gene 3000, 6000 (Corbett Research) та Rotor-Gene Q (QIAGEN))

№ блоку	Температура, °C	хв	сек	Кількість циклів	Детекція	Тип блоку
1	95	15	00	1		цикл
2	94	0	30	5		цикл
	64	0	17		v	
3	94	0	10	40		цикл
	64	0	17		v	
4	30	-	-	зберігання		зберігання

9.7. Після закінчення виконання програми приступити до аналізу та інтерпретації результатів.

10. КОНТРОЛЬ ПРОХОДЖЕННЯ РЕАКЦІЇ

10.1. У паспорті, що входить до кожної серії набору «УСМ-ПЛР», вказані граничні значення порогового (індикаторного) циклу для позитивного контрольного зразка (ПКЗ УСМ) та контролю біоматеріалу (КБ) по відповідному каналу флуоресценції.

10.2. Для кожної постановочної серії робиться висновок про достовірність результатів тесту на підставі порівняння отриманих показників ПКЗ УСМ із паспортними.

10.3. При отриманні значень порогового циклу, що перевищують гранично допустимі для ПКЗ УСМ, результати всієї постановочної серії вважають недостовірними. Всі зразки повинні бути досліджені повторно, починаючи з етапу ампліфікації.

10.4. При отриманні значень порогового циклу нижче гранично допустимого для НКЗ, результати всієї постановочної серії вважають недостовірними. Необхідне проведення дослідження повторно, починаючи з етапу екстракції ДНК.

Канал	НКЗ	ПКЗ	НКЗ	ПКЗ
FAM <i>U. urealyticum</i> ROX <i>C. trachomatis</i> Cy5 <i>M. genitalium</i>	>39 циклу	Відповідає паспортному значенню	<39 циклу	Не відповідає паспортному значенню
HEX Контроль біоматеріалу	>39 циклу	Відповідає паспортному значенню	<39 циклу	Не відповідає паспортному значенню
	Достовірно	Достовірно	Недостовірно. Провести аналіз повторно починаючи з етапу виділення ДНК	Недостовірно. Провести аналіз повторно починаючи з етапу ампліфікації

11. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

11.1. Для інтерпретації результатів необхідно проаналізувати отримані дані – криві накопичення флуоресцентного сигналу по двох каналах:

- продукт ампліфікації ДНК ***Ureaplasma urealyticum*** - по каналу **FAM/Green**;
- продукт ампліфікації ДНК ***Chlamydia trachomatis*** – по каналу **ROX/Orange**;
- продукт ампліфікації ДНК ***Mycoplasma genitalium*** – по каналу **Cy5/Red**;
- продукт ампліфікації ДНК **КБ** – по каналу **HEX/Yellow**.

11.2. Результати інтерпретуються в наступному порядку:

11.2.1. Аналіз результатів ампліфікації ДНК КБ для відповідного біоматеріалу по каналу **HEX/Yellow**:

- Якщо в таблиці результатів по каналу HEX/Yellow визначено значення порогового циклу **Ct**, що не перевищує 33 цикли (конкретне значення для кожної серії слід уточнювати в паспорті), то результат вважається достовірним, і можна переходити до наступного етапу аналізу результатів.

- Якщо для даної проби значення **Ct** не визначене (відсутнє) або перевищує значення порогового циклу **Ct** КБ по каналу HEX/Yellow (див. таблицю нижче і паспорт на серію набору), то результат вважається недостовірним. У цьому

випадку необхідно провести повторне ПЛР-дослідження відповідного зразка. Якщо недостовірний результат відтворюється, то отримані дані по каналам FAM/Green, ROX/Orange та Cy5/Red не враховуються, рекомендується призначити повторний забір біоматеріалу.

11.2.2. Аналіз результатів ампліфікації фрагментів ДНК *U. urealyticum*, *C. trachomatis* та *M. genitalium* по каналах FAM/Green, ROX/Orange та Cy5/Red відповідно:

- ДНК *U. urealyticum* **виявлена**, якщо для даної проби в таблиці результатів по каналу FAM/Green визначено значення, і воно не перевищує значення порогового циклу Ct. Характерне значення порогового Ct для каналів FAM - 39. (Конкретне значення для кожної серії слід перевіряти в паспорті).
- ДНК *U. urealyticum* **не виявлена**, якщо для даної проби значення Ct по каналу FAM/Green не визначене (відсутнє) або перевищує значення порогового циклу Ct по FAM/Green.
- ДНК *C. trachomatis* **виявлена**, якщо для даної проби в таблиці результатів по каналу ROX/Orange визначено значення, і воно не перевищує значення порогового циклу Ct. Характерне значення порогового Ct для каналів ROX - 39. (Конкретне значення для кожної серії слід перевіряти в паспорті).
- ДНК *C. trachomatis* **не виявлена**, якщо для даної проби значення Ct по каналу ROX/Orange не визначене (відсутнє) або перевищує значення порогового циклу Ct по ROX/Orange.
- ДНК *M. genitalium* **виявлена**, якщо для даної проби в таблиці результатів по каналу Cy5/Red визначено значення, і воно не перевищує значення порогового циклу Ct. Характерне значення порогового Ct для каналів Cy5 - 39. (Конкретне значення для кожної серії слід перевіряти в паспорті).
- ДНК *M. genitalium* **не виявлена**, якщо для даної проби значення Ct по каналу Cy5/Red не визначене (відсутнє) або перевищує значення порогового циклу Ct по Cy5/Red.

Канал	Зразок	Зразок	Зразок
FAM <i>U. urealyticum</i> ROX <i>C. trachomatis</i> Cy5 <i>M. genitalium</i>	>39 циклу	<39 циклу	>39 циклу
HEX Контроль біоматеріалу	<33 циклу	<33 циклу	>33 циклу
	Достовірно. ДНК <i>U. urealyticum</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>M. genitalium</i> не виявлена	Достовірно. Виявлена ДНК визначається відповідним каналом	Недостовірно. Провести аналіз повторно починаючи з етапу відбору зразка

Символ	Значення символу
	Виробник
	Номер за каталогом
	Номер партії
	Використати до
	Обмеження температури
	Тільки для ін вітро діагностики
	Увага!
	Інструкція з використання

Номер гарячої лінії технічної підтримки Клієнтів:

0-800-50-29-62

Усі дзвінки за номером гарячої лінії безкоштовні з будь-якого мобільного або стаціонарного телефону на всій території України.

ТОВ «Хема», 03179, м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23

+38 (044) 422-62-16

+38 (050) 422-62-16

e-mail: clients@xema.com.ua

XEMA Kiev

