

ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора

АмплиСенс

ПЦР-тест-системы

Кат.№ В19-100-Р0,2 FEP

АмплиСенс

вариант FEP

для ПЦР-амплификации ДНК

U.parvum / U.urealyticum

с гибридационно-флуоресцентной детекцией по

«конечной точке»

на 110 реакций

«только для *in vitro* диагностики»

Серия_05.12.06

Дата изготовления_05.12.06

Годеи до_01.09.07

Хранить при температуре от 2 до 8 °С

в защищенном от света месте

разработано для ПЦР-детектора «АЛА-1/4»
(«Biosan», Латвия)

Комплект «АмплиСенс» вариант FEP

для ПЦР-амплификации ДНК *U.parvum* / *U.urealyticum* с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке»

Комплект «АмплиСенс» вариант FEP входит в состав тест-системы «АмплиСенс® *U.parvum* / *U.urealyticum*-FL», предназначенной для дифференциации ДНК *U.parvum* и *U.urealyticum* в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Для выделения ДНК из биологического материала следует использовать комплекты реагентов «ДНК-сорб-А» или «ДНК-сорб-АМ» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора согласно инструкции производителя.

Комплект состоит из 6 реагентов.

ФОРМА ВЫПУСКА.

Реактив	Описание	Объём (мл)	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FEP <i>U.parvum</i> / <i>U.urealyticum</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,008	110 пробирок
ПЦР-смесь-2-Flu	Прозрачная бесцветная жидкость	0,77	1 пробирка
ПЦР-смесь-Фон	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО ДНК <i>U.parvum</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ПКО ДНК <i>U.urealyticum</i>	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
Количество реакций (в 25 мкл)			110

Комплект рассчитан на постановку 110 реакций, включая контрольные образцы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

1. Амплификатор (термоциклер) (например, «GeneAmp 2700» («Applied Biosystems», США), «Biometra», или «PalmCycler» («Corbett Research», Австралия).
2. ПЦР-детектор «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия).
3. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
4. Вортекс (например, «ГЭТА-2», «Биоком», Россия).
5. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
6. Одноразовые наконечники для микропипеток до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
7. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 (100) мкл в штативах (например, «Ахуген», США).
8. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных ДНК.
10. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
11. Емкость для сброса наконечников.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

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

Во всех наборах для амплификации семейства «АмплиСенс» обязательно применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением компонентов ПЦР-смеси прослойкой воска. Установка пробирок в прогретый до 95 °С блок термоциклера обеспечивает плавление воска и перемешивание реакционных компонентов при этой температуре. Таким образом, значительно снижается вероятность образования неспецифических продуктов и обеспечивается высокая чувствительность анализа.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FEP *U.parvum* / *U.urealyticum* для амплификации исследуемых и контрольных проб.
2. В пробирки с ПЦР-смесью-1-FEP *U.parvum* / *U.urealyticum* на поверхность застывшего воска раскатать по 7 мкл ПЦР-смеси-2-Flu, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP *U.parvum* / *U.urealyticum*.
3. Приготовить контрольный образец «Фон». Для этого в пробирку с ПЦР-смесью-1-FEP *U.parvum* / *U.urealyticum* на поверхность застывшего воска внести 17 мкл ПЦР-смеси-Фон, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FEP *U.parvum* / *U.urealyticum*. При анализе более 15 образцов рекомендуется приготовить и использовать 2 контрольных образца «Фон».
4. В готовые пробирки внести по 10 мкл ДНК-проб, выделенных из клинических или контрольных биологических проб.

5. Поставить контрольные реакции амплификации:
- отрицательный контрольный образец (К-) - вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
 - положительный контроль *U.parvum* (К1+) - внести 10 мкл ПКО ДНК *U.parvum*;
 - положительный контроль *U.urealyticum* (К2+) - внести 10 мкл ПКО ДНК *U.urealyticum*.

Б. Проведение амплификации (ПЦР):

- Запустить на амплификаторе соответствующую программу амплификации («65-60-45») (см. таблицу 1). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы) поставить пробирки* в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

*Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (2-3 с).

Таблица 1. Программа «65-60-45»:

цикл	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке):						Амплификаторы с матричным регулированием температуры:		
	«GeneAmp PCR System 2700» (Applied Biosystems)			«Gradient Palm Cycler» (Corbett Research)			«Biometra»		
цикл	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95°C	пауза		95°C	пауза		95°C	пауза	
1	95°C	5 мин	1	95°C	5 мин	1	95°C	5 мин	1
2	95°C	20 сек	20	95°C	20 сек	20	95°C	25 сек	20
	65°C	25 сек		65°C	20 сек		65°C	40 сек	
	72°C	30 сек		72°C	25 сек		72°C	40 сек	
3	95°C	20 сек	24	95°C	20 сек	24	95°C	25 сек	24
	60°C	30 сек		60°C	25 сек		60°C	40 сек	
	72°C	30 сек		72°C	25 сек		72°C	40 сек	
4	95°C	20 сек	1	95°C	20 сек	1	95°C	25 сек	1
	60°C	30 сек		60°C	25 сек		60°C	40 сек	
5	10°C	хранение		10°C	хранение		10°C	хранение	

- По окончании выполнения программы амплификации приступить к детекции с помощью прибора «АЛА-1/4».

В. Детекция результатов с помощью прибора «АЛА-1/4».

Работа с флуоресцентным ПЦР-детектором «АЛА-1/4» проводится в соответствии с инструкцией по эксплуатации ПЦР-детектора «АЛА-1/4».

Для детекции и учета результатов используются следующие настройки теста «*U.parvum/U.urealyticum*» программы «АЛА-1/4», заданные по умолчанию: пороговые значения для канала *FAM* и *HEX 1,9* и *2,4*; для ВКО указана детекция по каналу *ROX* и пороговое значение **2,5**.

Настройки теста можно просмотреть и изменить, выбрав закладки «Настройки», «Список тестов» в главном меню программы. (Для этого, введя указанные выше значения, следует нажать кнопку «Сохранить»).

- Включить прибор и запустить программу «АЛА-1/4» на компьютере, присоединенном к прибору.
- Задать протокол измерения, выбрав в верхнем меню «Протокол», «Создать новый». Выбрать тип ротора 48 x 0,2. Выбрать нужный тест («*U.parvum/U.urealyticum*») в списке тестов в меню. Ввести последовательность детектируемых образцов и фоновых образцов в колонке «Образец». Закрыть окно редактирования протокола детекции.
- В качестве образца (образцов), обозначенного «ФОН» использовать контрольный образец (образцы) «Фон» (для того, чтобы обозначить образец «ФОН» в графе образец, используется сочетание клавиш «Ctrl» + «F»).
- Поставить пробирки в ячейки предварительно снятого ротора прибора «АЛА-1/4» в соответствии с заданной последовательностью, установить ротор в модуль прибора, закрепив его фиксатором, и закрыть крышку. Запустить измерение с помощью значка детекции в панели активных кнопок (вверху экрана). По окончании детекции на экран будет выведена таблица результатов.

Прим. Если в одном протоколе проводится детекция более 48 образцов, то после окончания детекции серии из 48 образцов извлеките ротор, поместите в его ячейки следующую серию образцов, поместите ротор в прибор и для продолжения детекции нажмите кнопку «Продолжить» в окне программы

- Полученные данные интерпретируются программой автоматически (колонка «1» и «2» на экране). Для образцов, в которых обнаружена ДНК *Ureaplasma parvum* в колонке «1» в соответствующей строке будет указано «*U.parvum* - обнаружено» (на лиловом фоне), для образцов содержащих *Ureaplasma urealyticum* - в колонке «2» «*U.urealyticum* - обнаружено». Для образцов, в которых не обнаружены ДНК данных возбудителей, в соответствующей графе будет указано «*U.parvum (U.urealyticum)* - не обнаружено» (на голубом фоне). Для образцов, для которых получен сигнал, который нельзя однозначно интерпретировать (возможно, положительный), указан результат «сомнительно». Для таких образцов требуется повторное проведение анализа для получения достоверного результата. Образцы, в которых не детектируется (не

превышает фона) как специфический сигнал, так и сигнал ВКО, требующие повторного проведения анализа, обозначены знаком «нд» на желтом фоне.

6. Результат считается достоверным только в случае прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК.

Таблица 2. Оценка результатов анализа контрольных точек.

Контроли	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Результат отображаемый прибором			Интерпретация
		1	2	3	
ОК	Выделение ДНК	<i>U.parvum</i> - не обнаружено	<i>U.urealyticum</i> - не обнаружено	ВКО +	отрицательный
К-	ПЦР	<i>U.parvum</i> - нд	<i>U.urealyticum</i> - нд	ВКО -	отрицательный
К1+ (<i>U.parvum</i>)	ПЦР	<i>U.parvum</i> - обнаружено	<i>U.urealyticum</i> - нд	ВКО -	положительный на наличие ДНК <i>U.parvum</i>
К2+ (<i>U.urealyticum</i>)	ПЦР	<i>U.parvum</i> - нд	<i>U.urealyticum</i> - обнаружено	ВКО -	положительный на наличие ДНК <i>U.urealyticum</i>

Возможные ошибки:

1. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести ПЦР еще раз для образцов с отрицательным результатом.
2. Если в отрицательном контроле (ОК или К-) детектируется положительный сигнал, значит, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также предпринять меры по выявлению и устранению источника контаминации.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

Обеззараживание биоматериала и реагентов следует проводить на каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. См. на этикетке (устанавливается по наименьшему из сроков годности реагентов).

Транспортирование. Комплект транспортировать при температуре от 2 до 8 °С в течение трёх суток.

Хранение. Комплект хранить при температуре от 2 до 8 °С. Следует избегать длительного нахождения ПЦР-смеси-1-FEP *U.parvum* / *U.urealyticum* на свету.

Рекламации на качество направлять по адресу предприятия-изготовителя - ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, адрес 111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. ОБТК (495) 305-54-24, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru.