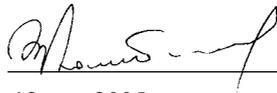


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



В.В. Колбанов

13 мая 2005 г.

Регистрационный № 57-0405

**ПРЯМОЙ
ФЛУОРЕСЦЕНТНО-ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ
АНАЛИЗ ДНК ХЛАМИДИЯ ТРАХОМАТИС,
МИКОПЛАЗМА ГОМИНИС И УРЕАПЛАЗМА
УРЕАЛИТИКУМ, АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ
МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Белорусская медицинская академия
последипломного образования

Авторы: канд. мед. наук С.А. Костюк, д-р мед. наук, проф. Г.Я. Хулуп, Н.А. Бадыгина

1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Установление активности воспалительного процесса при урогенитальных инфекциях, обусловленных хламидия трахоматис, микоплазма гоминис и уреоплазма уреалитикум на основании оценки интенсивности свечения ДНК возбудителя.

2. Оценка эффективности проведенного этиотропного лечения хламидийно-микоплазменных инфекций в полуколичественном формате при проведении исследований методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛОВ

1. Микропланшеточный фотометр-флуориметр.
2. Термостат-шейкер.
3. Микроцентрифуга-вортекс на 3000 об./мин.
4. Морозильник с рабочей температурой -20°C .
5. Холодильник с рабочей температурой $+2-8^{\circ}\text{C}$.
6. Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, переменным объемом 0,5–10 мкл, 5–50 мкл, 50–200 мкл, 200–1000 мкл.
7. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 0,5 мл.
8. Одноразовые наконечники до 300 мкл и до 1000 мкл.
9. Штативы для микропробирок и наконечников.
10. Перчатки резиновые хирургические.
11. Раствор амплифицированной ДНК-матрицы.
12. Дистиллированная вода.
13. Микропланшет со стрептавидным покрытием (96 лунок).
14. Диагностический набор, состоящий из следующих реагентов:
 - 14.1. Связывающий буфер — 20 мл.
 - 14.2. Стартовый буфер — 15 мл.
 - 14.3. Денатурирующий буфер — 15 мл.
 - 14.4. Первый отмывочный буфер — 15 мл.
 - 14.5. Второй отмывочный буфер — 20 мл.
 - 14.6. Буфер для разбавления гибридизационного зонда — 10 мл.
 - 14.7. Буфер для измерения — 20 мл.

3. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

3.1. Подготовка амплифицированных образцов

3.1.1. В пробирки, содержащие амплификационные образцы, добавить по 200 мкл связывающего буфера, встряхнуть и отцентрифугировать в течение нескольких секунд на микроцентрифуге-вортексе.

3.2. Детекция амплифицированной ДНК микроорганизма

3.2.1. В лунки микропланшета добавить по 100 мкл стартового буфера.

3.2.2. Инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин.

3.2.3. Освободить лунки от стартового буфера, добавить в две лунки, предназначенные для отрицательного гибридизационного контроля, по 110 мкл стартового буфера.

3.2.4. В каждую лунку микропланшета внести по 110 мкл анализируемого образца, смешанного на предыдущем этапе со стартовым буфером.

3.2.5. Инкубировать в течение 30 мин в термостате-шейкере при 37 °С и 600 об./мин.

3.2.6. Освободить лунки микропланшета. Добавить в каждую лунку по 100 мкл денатурирующего буфера. Инкубировать при комнатной температуре 10 мин.

3.2.7. Приготовить гибридизационную смесь из расчета 100 мкл буфер для разбавления гибридизационного зонда + 1 мкл гибридизационного зонда $\times N$, где N — количество анализируемых образцов.

3.2.8. Освободить лунки микропланшета. Трижды промыть лунки 300 мкл отмывочного буфера.

3.2.9. Добавить в каждую лунку по 100 мкл гибридизационной смеси.

3.2.10. Инкубировать в течение 30 мин в термостате-шейкере при 60 °С и 600 об./мин.

3.2.11. Освободить лунки микропланшета, трижды отмыть лунки 300 мкл отмывочным буфером.

3.2.12. Добавить в каждую лунку по 200 мкл буфера для измерения.

3.2.13. Инкубировать при комнатной температуре 20 мин.

3.3. Идентификация результатов

3.3.1. Провести измерение флуоресценции на микропланшеточном фотометре-флуориметре ФФМ-01, настроенном на волну возбуждения 485 нм и волну испускания 538 нм.

3.3.2. Идентификацию результатов осуществлять по интенсивности флуоресценции в исследуемой биологической пробе, выраженной в относительных флуоресцентных единицах (о.ф.е.):

3.3.2.1. Диагностически значимой концентрацией ДНК *Chlamydia trachomatis* в биологической пробе является количество ДНК, которое определяет флуоресценцию с интервалом интенсивности свечения 1 000 000,0–200,0 о.ф.е., обуславливая активный воспалительный процесс уrogenитального тракта. Единичные копии ДНК *Chlamydia trachomatis* определяют флуоресценцию с интервалом интенсивности свечения 200,0–150,0 о.ф.е., обуславливая скрытый неактивный воспалительный процесс уrogenитального тракта. При интервале флуоресценции 150,0 – «-»1000,0 о.ф.е. наблюдается отсутствие ДНК *Chlamydia trachomatis*.

3.3.2.2. Диагностически значимой концентрацией ДНК *Ureaplasma urealyticum* в биологической пробе является количество ДНК, которое определяет флуоресценцию с интервалом интенсивности свечения 1 000 000,0–150,0 о.ф.е., обуславливая активный воспалительный процесс уrogenитального тракта. Единичные копии ДНК *Ureaplasma urealyticum* определяют флуоресценцию с интервалом интенсивности свечения 150,0–100,0 о.ф.е., обуславливая скрытый неактивный воспалительный процесс уrogenитального тракта. При интервале флуоресценции 100,0–«-»1000,0 о.ф.е. наблюдается отсутствие ДНК *Ureaplasma urealyticum*.

3.3.2.3. Диагностически значимой концентрацией ДНК *Mycoplasma hominis* в биологической пробе является количество ДНК, которое определяет флуоресценцию с интервалом интенсивности свечения 1 000 000,0–200,0 о.ф.е., обуславливая активный воспалительный процесс уrogenитального тракта. Единичные копии ДНК *Mycoplasma hominis* определяют флуоресценцию с интервалом ин-

тенсивности свечения 150,0–130,0 о.ф.е., обуславливая скрытый неактивный воспалительный процесс уrogenитального тракта. При интервале флуоресценции 130,0–«-»1000,0 о.ф.е. наблюдается отсутствие ДНК *Mycoplasma hominis*.

4. ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Нарушение технологии выполнения ПЦР-анализа.
2. Нарушение требований к организации и правилам работы ПЦР-лаборатории.
3. Нарушение правил хранения реактивов.
4. Нарушение требований к проведению дезинфекции, обеззараживанию биологического материала и лабораторного оборудования.

Пути устранения ошибок:

1. Соблюдение последовательности операций и аккуратное выделение ДНК из анализируемого биологического материала является обязательным.

2. Все этапы проведения ПЦР выполняются в стерильных условиях в трех рабочих зонах:

- зона 1 — выделение ДНК возбудителей в биологических пробах;
- зона 2 — проведение синтеза ДНК или собственно амплификации;
- зона 3 — детекция и анализ результатов исследований.

Пробы из зоны 3 не следует переносить в зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей.

Работа должна проводиться в лабораторной одежде, сменяемой при переходе из одного помещения в другое, и в одноразовых перчатках, так как анализируемые биологические пробы являются потенциально опасным инфицированным материалом. Обработка одежды из разных помещений должна производиться отдельно. На разных этапах проведения ПЦР-анализа работать должны различные сотрудники.

Следует использовать отдельные наборы полуавтоматических пипеток, предназначенных для различных стадий анализа и непереносимых из одного помещения в другое.

3. Приготовление основных растворов также должно производиться в отдельной чистой комнате. Все растворы должны храниться и использоваться в небольших порциях. Клинические образцы следует хранить отдельно от реагентов.

4. Обязательно необходимо менять наконечники при переходе от пробы к пробе, желательно использовать наконечники с фильтром — аэрозольным барьером для предотвращения попадания микрокапель раствора в пипетку.

Использованные пробирки и наконечники должны сбрасываться в специальные контейнеры или емкости, содержащие дезинфицирующий раствор (1 N соляная кислота, 10% гипохлорит натрия или 10% хлорная известь).

Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует облучать ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм. Облучение необходимо проводить в течение 1 ч до начала работы и в течение 1 ч после окончания работы.