

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53				МИ-10-037
Квалитативна детекција ДНК бактерије Chlamydia trachomatis Real - Time PCR методом					
Страна 1 од 6	Издање:	Важи од:	Сагласан:	Одобрио	Копија број
	2	2025-02-05	Проф. Никола Танић	др Санда Лазић руководилац Службе за микробиологију са паразитологијом	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

***Chlamydia trachomatis* Real-TM PCR** кит је *in vitro* амплификациони тест намјењен за квалитативну детекцију ДНК бактерије *Chlamydia trachomatis* из клиничких материјала (урогенитални, ректални и брисеви грла; исцједак из очију, урин, секрет простате) помоћу детекције флуоресценције у реалном времену.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Детекција бактерије *Chlamydia trachomatis* ланчаном реакцијом полимеразе (PCR) се базира на амплификацији специфичног региона генома патогена помоћу специфичних прајмера (граничника).

Продукти PCR реакције се детектују помоћу флуоресцентних боја које су везане за олигонуклеотидне пробе и које се специфично везују за амплификационе продукте.

Флуоресцентни сигнал се повећава током реакције како се продукти умножавају и то је могуће пратити у реалном времену без отварања реакционих туба након завршетка реакције.

***Chlamydia trachomatis* Real - TM PCR** кит је квалитативни тест који садржи интерну контролу (IC) која се мора користити током екстракције ДНК у циљу контроле екстракционог процеса сваког појединачног узорка и идентификације могуће инхибиције.

***Chlamydia trachomatis* Real-TM PCR** кит користи “*hot-start*” који смањује учесталост неспецифичног везивања прајмера. “Hot - start” је омогућен употребом хемијски модификоване полимеразе (*TaqF*) која се активира загријавањем на 95 °C у трајању од 15 мин.

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

Аналитичка осјетљивост ***Chlamydia trachomatis* Real - TM PCR** комплета наведена је у табели испод:

Табела 1:

Клинички материјал	Кит за екстракцију ДНК	Аналитичка осетљивост, GE / ml*
Урогенитални брисеви	<i>DNA- sorb-A</i>	5 x 10 ²
Урин	<i>DNA- sorb-A</i>	1 x 10 ³

* Геномски еквивалент (GE) микроорганизма по 1ml клиничког узорка стављеног у наведени транспортни медијум.

Болница Бијељина	Страна 2 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-037
		2	2025-02-05	

4. ВРСТА УЗОРКА

Аналитичка специфичност ***Chlamydia trachomatis Real - TM PCR*** кита је осигурана избором специфичних прајмера и проба, као и одабиром строгих услова реакције. Прајмери и пробе су провјерене на могуће хомологије са свим секвенцама објављеним у банкама гена анализом поређења секвенци. Није било неспецифичних одговора током испитивања хумане ДНК, као и ДНК панела сљедећих микроорганизама: *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *Mycobacterium*, *Candida albicans*, *Mycoplasma genitalium*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, HSV tip 1 i 2, HPV CMV.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Припрема пацијената се обавља према упутству УП-10-135: Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику, тачка 9.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

Дакронски брис са пластичном или металном дршком у стерилној епрувети (брис цервикса, брис уретре код мушкарца).

Стерилна посуда са навојем (урин).

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

- ДНК екстракциони кит;
- Транспортни медијум;
- Једнократне рукавице без пудера;
- Пипете (подесиве);
- Стерилни наставци за пипете са филтером до 200µl;
- Сталци за тубе;
- Вортекс;
- Центрифуга са ротором погодним за тубе од 2ml;
- *PCR* бокс;
- *Real Time PCR* апарат;
- Полипропилен микротубе за *PCR* или *PCR* – плоча;
- Фрижидер 2–8 °C;
- Замрзивач за дубоко замрзавање ≤ -16 °C;
- Канта за отпатке.

Табела 2:

Реагенси	Опис	Запремина (ml)	Количина
<i>PCR-mix-1-FRT</i> <i>Chl.trachomatis</i>	безбојна бистра течност	1,2	1 туба
<i>PCR-mix-2-FRT</i>	безбојна бистра течност	0,3	2 тубе
<i>Polymerase (TaqF)</i>	безбојна бистра течност	0,03	2 тубе
<i>Positive Control complex (C+)</i>	безбојна бистра течност	0,2	1 туба

Болница Бијељина	Страна 3 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-037
		2	2025-02-05	

DNA - buffer	безбојна бистра течност	0,5	1 туба
Negative Control (C-)*	безбојна бистра течност	1,2	1 туба
Internal Control - FL (IC)**	безбојна бистра течност	1,0	1 туба

*мора бити употребљена током процеса екстракције као негативна контрола екстракције

**додати 10µl интерне контроле FL током ДНК екстракције директно у узорак/пуфер за лизу

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Управљање условима средине и безбједношћу се одвија према: УП-10-023: *Употреба средстава личне заштите у Служби за микробиологију са паразитологијом*; УП-10-138: *Обезбјеђивање и праћење услова радне средине у процесу испитивања*; УП-10-156: *Биосигурност у PCR лабораторији*; УП-10-142: *Мјере заштите на раду у Служби за микробиологију са паразитологијом*.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Није примјењиво.

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

При доспијећу узорака у лабораторију додијељује им се уникатни број протокола према упутству УП-10-135: *Упутство за узимање и транспорт узорака за микробиолошку дијагностику*, тачка 4.3. Након тога слиједи обрада узорка која подразумева:

1. ЕКСТАКЦИЈУ ГЕНЕТИЧКОГ МАТЕРИЈАЛА (ДНК МОЛЕКУЛА);
2. ПРИПРЕМУ И ПОКРЕТАЊЕ РЕАКЦИЈЕ ЛАНЧАНЕ ПОЛИМЕРАЗЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ (RT – PCR);
3. ИНТЕРПРЕТАЦИЈУ РЕЗУЛТАТА.

ПОСТУПАК ЕКСТРАКЦИЈЕ ДНК

Екстракција се обавља у биосигурносном кабинету класе II у просторији за изолацију нуклеинских киселина.

Материјал и опрему намијењене за обраду и рад у просторији за екстракцију користити искључиво на том простору за описане процедуре и не преносити из једне радне просторије у другу.

При раду се обавезно користе дупле једнократне нитрилне рукавице без пудера, које се често дезинфикују или мијењају, нарочито ако дође до просипања течности или када постоји сумња на контаминацију.

Обавезно је ношење мантила (скафандера) који је намијењен само за простор за изолацију нуклеинских киселина.

Зависно од врсте произвођача разликују се и протоколи екстракције. Сваки екстракциони протокол/упутство се чува у електронској форми у Регистратору протокола у оригиналном и/или преведеном издању. Скраћене верзије и изводи из наведених упутстава се по потреби чувају на видном месту у просторији за екстракцију.

- Непосредно прије екстракције узорке извадити из фрижидера и темперирати на собној температури, припремити пипете, наставке са дуплим филтером за пипете, контејнере за лабораторијски отпад, тубе.

Болница Бијељина	Страна 4 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-037
		2	2025-02-05	

- Након пресипања узорка у адекватно обележене тубе од 2ml, приступа се поступку екстракције према протоколу.
- Узорак прије изолације мијешати на вортексу, пажљиво отворити, уз мјере личне заштите и у биосигурносном кабинету, те пипетирати око 1,5 ml у тубу за чување узорка на -80 °C или -20 °C, а потом слиједити инструкције произвођача екстракционог кита. Овако складиштени узорци се могу чувати годину дана на -20 °C, а на температури од -80 °C и дуже .
- Након пресипања узорка у адекватно обележене тубе, приступа се поступку екстракције према протоколу.
- **Кораци у поступку екстракције су:**
 1. лиза ћелија и ослобађање ћелијских елемената,
 2. преципитација ослобођених молекула нуклеинских киселина, најчешће алкохолом,
 3. испирање и пречишћавање,
 4. елуција ДНК.

Након последњег корака, тј. елуције ДНК, изолована ДНК се пребацује у тубе од 1,5 ml и уколико се истог дана припрема *Real time PCR* реакција, чува се у фрижидеру до момента спајања узорка са мастер миксом, а у супротном се одлаже у замрзивач на -20 °C до постављања *PCR* реакције.

- Послије рада очистити биосигурносни кабинет и кориштену опрему 70% алкохолом и укључити УВ лампу. Спремити реагенсе и прибор за следећу употребу.

Може се користити било који комерцијални комплет (кит) за екстракцију РНК / ДНК, ако је *IVD-CE* валидиран за типове узорака који су одвије наведени у параграфу „СКУПЉАЊЕ, СКЛАДИШТЕЊЕ И ТРАНСПОРТ УЗОРАКА“.

Sacace Biotechnologies препоручује употребу следећих китова:

- **DNA – Sorb - A** (Sacace, REF K-1-1/A),
- **SaMag STD DNA** екстракциони кит (Sacace, REF SM007).

Екстракција ДНК се изводи према упутствима произвођача.

Припрема и покретање реакције ланчане полимеразе у реалном времену (*Real time RT PCR*)

Провјерити да ли су сви неопходни уређаји и опрема одговарајући, калибрисани и функционални прије почетка рада. Ради добијања што прецизнијег резултата (да би се избјегла контаминација и добијање лажно позитивних резултата или потенцијална инхибиција) пожељно је поступке припреме реакције радити у одвојеним просторијама и придржавати се одређених мјера опреза:

- Носити чист мантил и рукавице приликом припреме узорака за *PCR* амплификацију (који нису ношени током руковања амплификованим *PCR* производима или током припреме узорка);
- Сви наставци за пипете и тубе за центрифугу морају бити ослобођени ДНаза и РНаза;
- Мастер микс припремати искључиво у просторији са том намјеном;
- Све компоненте *PCR* реакције одмрзнути (осим уколико произвођач не нагласи другачије) и вортексовати благо ради обезбјеђивања равномјерне дистрибуције свих;
- Кратким центрифугирањем спустите течност на дно тубе;
- Израчунати број реакција за тестирање и налити реагенсе по упутству произвођача (обухвата негативну контролу, позитивну контролу и узорке који се тестирају). Препорука је да се припреми мастер микс за још 2 додатне реакције да би се компензовале грешке у пипетирању;

Болница Бијељина	Страна 5 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-037
		2	2025-02-05	

- Припремити стрипове за *PCR* од 8 тубица сходно броју реакција;
- Уколико се као негативна контрола користи dH_2O , она се додаје одмах по разливању мастер микса, прије него што се пренесе у просторију за додавање узорак и позитивних контрола. У случају да се негативна контрола екстрахује паралелно са узорцима, тада се и она додаје у просторији за спајање узорак са мастер миксом;
- Припремљени мастер микс се кроз прозор преноси у просторију за спајање са узорцима;
- Сва опрема и реагенси који се употребљавају у просторији за мастер микс треба да остану у њој и да се не премјештају или користе у другим просторијама. Након припреме треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор.

Спајање узорак са мастермиксом

У просторији за спајање узорак са мастер миксом потребно је, такође, користити све мјере опреза већ раније поменуте. Неопходно је пажљиво отворити и затварати тубице са узорцима и избежавати прскање. Узорци се све вријеме држе на апарату за мјешање на температури од 4-8 °C (*ThermoMixer C*).

Реагенси и све компоненте неопходне за рад треба што је могуће дуже држати затворенима/поклопљенима како би се спријечила контаминација или инхибиција.

Када се додају сви узорци потребно је провјерити да ли су сви стрипови добро затворени, обиљежени и још једном их ставити на центрифугу како би садржај равномерно пао на дно био и спреман за *PCR* апарат.

Тakoђе, сва опрема која се употребљава у просторији за спајање узорак треба да остане у њој и да се не премјешта или користи у другим просторијама. Након завршеног рада треба очистити и дезинфиковати радну површину и лабораторијски прибор.

Покретање *PCR* апарата:

- Укључити апарат за *PCR* и програмирати га унапријед (према препорукама произвођача кита и упутству за руковање апаратом *Quant Studio 5*).
- Након тога покренути *PCR* реакцију. Поставке реакције (термални профил, читавање флуоресценције) претходно извршити према упутствима произвођача датог кита.
- Никад не отворити амплификоване *PCR* продукте.
- По завршетку реакције, не отворити реакционе тубе (стрипове), да не би дошло до контаминације, и одбацити их у складу са локалним препорукама и прописима.
- За прецизније инструкције за поставку *PCR* реакције погледати оригинално упутство произвођача датог кита. Сва упутства се чувају у лабораторији у оригиналном и/или преведеном издању.

Податке о реакцији ланчане полимеразе у реалном времену уносимо у образац ОБ-10-146: *Радна листа пи-си-ар дијагностике*.

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Дефинисана количина интерне контроле (*IC*) се уноси у сваки узорак и у контролу квалитета на почетку поступка припреме узорка како би се контролисао процес екстракције сваког појединачног узорка и идентификовала могућа инхибиција реакције.

Негативна контрола екстракције (*NCE*), негативна контрола амплификације (*NCA*) и позитивна контрола амплификације (*C+*) потребне су за свако испитивање како би се потврдило да су припрема узорка, амплификација и кораци детекције исправно изведени.

Болница Бијељина	Страна 6 од 6	Издање:	Важи од:	МИ-10-037
		2	2025-02-05	

Ако су контроле изван свог очекиваног опсега (који се налази у упутству у Резултати за контроле), сви узорци и контроле из тог циклуса морају се обрадити почевши од корака припреме узорка.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ (НА ПРИМЈЕР, ЛИПЕМИЈА, ХЕМОЛИЗА, БИЛИРУБИНЕМИЈА, ЛИЈЕКОВИ) И УНАКРСНЕ РЕАКЦИЈЕ

Није примјењиво.

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА, А КАДА ЈЕ ТО РЕЛЕВАНТНО И МЈЕРНА НЕСИГУРНОСТ ИЗМЈЕРЕНИХ КВАНТИТАТИВНИХ ВРИЈЕДНОСТИ

Није примјењиво.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Налаз тумачити у складу са клиничком сликом.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Резултати се издају на 3 - 14 дана.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА КАДА РЕЗУЛТАТ НИЈЕ У ОКВИРУ ИНТЕРВАЛА МЈЕРЕЊА

Није примјењиво.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ, КАДА ЈЕ ОДГОВАРАЈУЋЕ

Није примјењиво.

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

Налаз тумачити у складу са клиничком сликом.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Није примјењиво.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

Оригинално упутство произвођача *Chlamydia trachomatis Real - TM, Sacace Biotechnologies*.

Оригинално упутство за руковање *Quant Studio 5 PCR* апарат.

Оригинални научни радови који се баве тематиком *Real Time PCR* - а (Bustin et al, Vondesample et al...).