

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для дифференциального выявления и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный» предназначен для дифференциального выявления и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска (ВКР) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР).

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» и «РеалБест экстракция 100».

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Таq-полимеразой.

В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридизационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Таq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

В анализируемых образцах дополнительно оценивается содержание ДНК гена HMBS человека с целью валидации качества забора материала и повышения достоверности результатов количественного определения вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР).

Для анализа каждого образца на содержание ДНК ВПЧ ВКР используется половина стрипа – 4 пробирки с ГРС 1, 2, 3, 4 в каждой из которых осуществляется амплификация ДНК трёх из 12 типов ВПЧ (см таблицу 1), а также одна пробирка с ГРС 5 для оценки содержания ДНК гена HMBS человека в образце.

Таблица 1

Пробирка	Типы ВПЧ
ГРС 1	16, 18, 39
ГРС2	33, 45, 56
ГРС3	31, 35, 58
ГРС4	52, 51, 59

2.2. Состав набора:

– положительный контрольный образец (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагмента ДНК гена HMBS человека и ДНК ряда вирусов папилломы человека, в

том числе ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов, лиофилизированный – 2 флакона;

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС 1, 2, 3, 4), лиофилизированная – 4 планшета по 96 пробирок (каждый планшет состоит из 12 стрипов по 8 пробирок);

– готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС 5), лиофилизированная – 96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок);

– раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон, 4 мл.

Набор дополнительно комплектуется:

– стрипированными крышками для пробирок (60 стрипов по 8 штук) или оптической плёнкой – 6 листов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов (100 копий ДНК в пробе) – 100 %.

3.2. Специфичность выявления ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов (по образцам, не содержащим ДНК данного типа ВПЧ, но содержащим ДНК восьми других типов ВПЧ) – 100 %.

3.3. Специфичность выявления ДНК гена HMBS человека (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов (СПП ВПЧ) как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные) – 100 %.

3.4. Чувствительность выявления ДНК гена HMBS человека (250 копий ДНК в пробе) – 100%.

3.5. «Линейность» – совпадение измеренного значения и предписанного значения (вычисленного с учётом фактора разведения) логарифма концентрации ДНК ВПЧ – в пределах 90-110%.

3.6. Коэффициент вариации (К.В.) для значений логарифма концентрации ДНК ВПЧ – не более 10%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени:
«iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Финляндия);

- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитропреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный);
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать не менее 30 минут при температуре от 18 до 25 °С.

Выделенную ДНК хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 2 суток.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать готовые реакционные смеси для ПЦР (ГРС 1, 2, 3, 4, 5) в упаковке (не вскрывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС 1, 2, 3, 4, 5. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Для анализа каждого образца (включая контрольные образцы) требуется 4 пробирки с ГРС (половина стрипа, содержащая ГРС 1, ГРС 2, ГРС 3, ГРС 4) и 1 пробирка с ГРС 5.

Пробирка с ГРС 1 отмечена линией.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет 3 месяца при температуре хранения от 2 до 8 °С.

7.2. Вскрыть флакон с ПКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Добавить 1 мл раствора для восстановления контрольного образца (РВК). Аккуратно перемешать, выдержать при комнатной температуре 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать.

ПКО готов к процедуре выделения ДНК.

После разведения хранить флакон с ПКО при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

7.3. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с готовой реакционной смесью для ПЦР (ГРС) пронумеровать и расположить в штативе (см. схему).

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Крышки или оптическая плёнка должны оставаться чистыми!

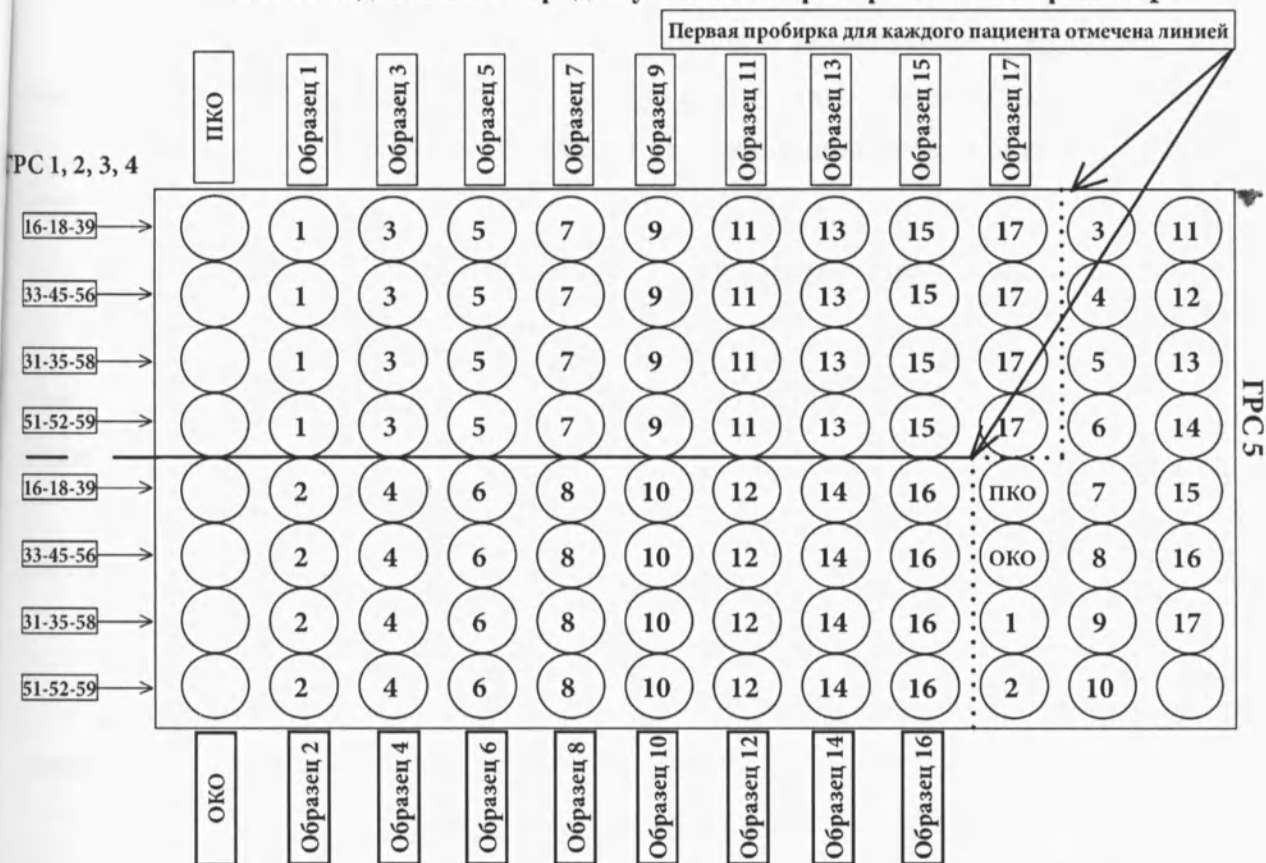
7.4. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Плотнo закрыть пробирки крышками или заклеить оптической плёнкой.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК и ДНК ВКО, и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

Схема

Рекомендованный порядок установки пробирок в амплификатор



Для анализа каждого образца используется один стрип из 4-х пробирок

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 25 сек).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК.

ГРС 1-4:

Для регистрации сигнала при амплификации ДНК ВКО в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором Cy5. Для детекции следует выбирать канал детекции «Cy5».

Для регистрации сигнала при амплификации ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска в системе применены гибридационные ДНК-зонды, меченные флуорофорами FAM, HEX, ROX. Для детекции следует выбирать каналы детекции «FAM», «HEX», «ROX».

ГРС-5:

Для регистрации сигнала при амплификации ДНК ВКО в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM».

Для регистрации сигнала при амплификации ДНК гена HMBS человека в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором ROX. Для детекции следует выбирать канал детекции «ROX».

7.9. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.10. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

При применении набора с амплификаторами «iQ5 iCycler», «CFX96» и программой «РеалБест диагностика» программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов учет результатов проводить в соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В положительном контрольном образце (ПКО) в каждой из ГРС 1-4 программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять значение

порогового цикла C_t ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВПЧ (каналы «FAM», «HEX», «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО для каждого сигнала.

Для ПКО в ГРС 5 программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS человека (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО.

9.2. Для отрицательного контрольного образца (ОКО) в каждой из ГРС 1-4 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «FAM», «HEX» и «ROX» до C_t 35.

Если для ОКО значение C_t по каналам «FAM», «HEX» и «ROX» меньше или равно 35, то это свидетельствует о наличии контаминации.

Для ОКQ в ГРС 5 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО. При этом программа не должна фиксировать нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX» до C_t 32.

Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 32, то это свидетельствует о наличии контаминации.

9.3. Анализ результатов валидации образца

9.3.1. В каждом исследуемом образце в ГРС 5 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM»).

9.3.2. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.3.3. Анализируемый образец считается валидным, если для этого образца в ГРС 5 значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 32.

9.3.4. Для образцов, признанных невалидными (C_t по каналу «ROX» в ГРС 5 больше 32) необходимо провести повторный забор материала для исследования.

Внимание! Анализ исследуемого образца считается действительным только в том случае, если при анализе на валидацию образец признан валидным.

Валидация образца позволяет оценить правильность забора материала и его хранения. В случае, если эпителиальный соскоб забран неправильно (недостаточное количество эпите-

иальных клеток) или хранился в условиях, не обеспечивающих сохранность ДНК, сигнал амплификации ДНК гена HMBS человека будет заниженным, и образец будет признан невалидным.

Отрицательный результат выявления ДНК ВПЧ ВКР в таком случае может быть ложным.

9.4. Анализ результатов выявления ДНК ВПЧ ВКР.

9.4.1. В каждом исследуемом образце в ГРС 1-4 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Сy5») и определять C_t ВКО.

9.4.2. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО) отдельно для каждой из ГРС 1-4. Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.4.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ ВКР, если для этого образца значение C_t в каком-либо из каналов «FAM», «HEX» и «ROX» (в любой из пробирок с ГРС 1-4) меньше или равно 35. Соответствие результатов анализа типам ВПЧ приведено в таблице 2.

Анализируемые образцы могут содержать ДНК ВПЧ одного или нескольких типов в любых сочетаниях.

Таблица 2

пробирка	Положительный результат детекции в канале		
	«FAM»	«HEX»	«ROX»
ГРС 1	16 тип	39 тип	18 тип
ГРС 2	33 тип	56 тип	45 тип
ГРС 3	31 тип	58 тип	35 тип
ГРС 4	52 тип	59 тип	51 тип

9.4.4. Анализируемый образец считается отрицательным, не содержащим ДНК ВПЧ ВКР (не содержащим ДНК ВПЧ соответствующего типа), если для этого образца значение C_t в каком-либо из каналов «FAM», «HEX» и «ROX» больше 35 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.4.5. Если для ОКО значение C_t по каналам «FAM», «HEX» или «ROX» (в любой из пробирок с ГРС 1-4) меньше или равно 35 или значение C_t по каналу «ROX» в ГРС 5 меньше или равно 32, то это свидетельствует о наличии контаминации. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положи-

9.6. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения

ЗАО «Вектор-Бест»

Суть

А.В. Трухина

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

В.К. Ткачев

«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической

лабораторной диагностики

ГБОУ ДПО РМАПО

Минздравсоцразвития России

В.К. Ткачев
В.К. Ткачев
Подпись: *В.К. Ткачев*
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись: *В.К. Ткачев*
20 ____ года
д.м.н., профессор Долгов В.В.
«07» 02 2012

[Handwritten signature]



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для дифференциального выявления и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный» предназначен для дифференциального выявления и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска (ВКР) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» и «РеалБест экстракция 100».

Комплект 2 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия) или их аналогами.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 99 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридизационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Таq-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО) (РС 1, 2, 3, 4 канал «Red»).

В анализируемых образцах дополнительно оценивается содержание ДНК гена HMBS человека с целью валидации качества забора материала и повышения достоверности результатов количественного определения вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (РС 5).

Для анализа содержания ДНК ВПЧ ВКР в одном образце используется четыре пробирки, содержащие РС 1, 2, 3, 4, в каждой из которых осуществляется амплификация ДНК трёх из 12 типов ВПЧ (см. Таблицу 1), а также одна пробирка с РС 5 для оценки содержания ДНК гена HMBS человека в образце.

Таблица 1

Пробирка	Типы ВПЧ
РС1	16, 18, 39
РС2	33, 45, 56
РС3	31, 35, 58
РС4	52, 51, 59

2.2. Состав набора:

– положительный контрольный образец (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагмента ДНК гена HMBS человека и ДНК ряда вирусов папилломы человека, в том числе ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов, лиофилизированный – 2 флакона;

– реакционная смесь для ПЦР (РС 1, 2, 3, 4), лиофилизированная – 44 пробирки (по 11 пробирок каждой РС, 1 пробирка на 9 определений);

– реакционная смесь для ПЦР (РС 5), лиофилизированная – 11 пробирок (1 пробирка на 9 определений);

– раствор для восстановления (РВ) – 8 флаконов (по 2,0 мл);

– раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 флакон (4,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется пробирками 0,2 мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов (100 копий ДНК в пробе) – 100 %.

3.2. Специфичность выявления ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов (по образцам, не содержащим ДНК данного типа ВПЧ, но содержащим ДНК восьми других типов ВПЧ) – 100 %.

3.3. Специфичность выявления ДНК гена HMBS человека (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов (СПП ВПЧ) как процентное содержание образцов, определенных набором как отрицательные) – 100 %.

3.4. Чувствительность выявления ДНК гена HMBS человека (250 копий ДНК в пробе) – 100%.

3.5. «Линейность» – совпадение измеренного значения и предписанного значения (вычисленного с учётом фактора разведения) логарифма концентрации ДНК ВПЧ – в пределах 90-110%.

3.6. Коэффициент вариации (К.В.) для значений логарифма концентрации ДНК ВПЧ – не более 10%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия) или аналогичный;

– ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Ленпипет, Россия; фирма Biohit, Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия);

– штативы для микропробирок вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);

– пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма Axugen, США) или аналогичные;

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения ДНК.

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать не менее 30 минут при температуре от 18 до 25 °С.

Выделенную ДНК хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с РС 1, 2, 3, 4, 5 для ПЦР и выдержать их при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут.

Внимание! Для анализа каждого образца (включая контрольные образцы) требуется РС пяти наименований (РС1, РС2, РС3, РС4, РС5). 1 пробирка с РС рассчитана на 9 проб.

Оставшиеся неиспользованными пробирки с РС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

Неиспользованную лиофилизированную РС хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности набора.

В пробирку с реакционной смесью для ПЦР (РС) добавить 250 мкл раствора для восстановления (РВ), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при температуре от 18 до 25 °С, после чего вновь тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

После разведения хранить РС при температуре от 2 до 8 °С не более суток или при температуре минус (15-20) °С — не более 2 недель.

После размораживания повторное замораживание не допускается.

Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 месяцев.

7.2. Вскрыть флакон с ПКО, удалив пластиковую крышку и резиновую пробку. Добавить 1 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК). Аккуратно перемешать, выдержать при комнатной температуре 15 минут, после чего вновь тщательно перемешать. ПКО готов к процедуре выделения ДНК.

После разведения хранить флакон с ПКО при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

7.3. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли), учитывая, что для анализа каждого образца необходимо 5 пробирок, которые следует пронумеровать 1, 2, 3, 4, 5, в соответствии с номером РС, которая будет внесена в данную пробирку.

Внимание! Надписи следует располагать на крышках пробирок.

7.4. В пробирки пипеткой с наконечником с фильтром внести по 25 мкл соответствующей разведенной РС.

7.5. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК (каждый образец внести в 5 пробирок, содержащие РС 1, 2, 3, 4, 5). Плотно закрыть пробирки крышками.

7.6. Поместить пробирки в амплификатор.

7.7. Запрограммировать прибор для проведения амплификации ДНК специфических фрагментов ДНК и ДНК ВКО, и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

Соответствие каналов детекции приборов «Rotor-Gene 3000» и «Rotor-Gene 6000»/«Rotor-Gene Q» приведено в Таблице 2.

Таблице 2

«Rotor-Gene 3000»	«Rotor-Gene 6000»/ «Rotor-Gene Q»
FAM	Green
JOE	Yellow
ROX	Orange
Cy5	Red

Термины, соответствующие разным версиям приборов и программного обеспечения указаны в следующем порядке: «Rotor-Gene 3000» («Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»).

7.8. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

– для приборов «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» и «Rotor-Gene Q»:

1 стадия: 50 °С – 2 мин;

2 стадия: 95 °С – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 25 сек).

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C по каналам FAM, JOE, ROX, Cy5 («Green», «Yellow», «Orange», «Red»).

7.9. Выбрать каналы детекции амплификации ДНК

PC 1-4:

Для регистрации сигнала при амплификации ДНК ВКО в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором Cy5. Для детекции следует выбрать канал Cy5 («Red»).

Для регистрации сигнала при амплификации ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска в системе применены гибридационные ДНК-зонды, меченные флуорофорами FAM, HEX, ROX. Для детекции следует выбрать каналы детекции FAM, JOE, ROX («Green», «Yellow», «Orange»).

PC-5:

Для регистрации сигнала при амплификации ДНК гена HMBS человека в системе применены гибридационные ДНК-зонды, меченные флуорофорами FAM. Для детекции следует выбрать канал детекции FAM («Green»).

7.10. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

7.11. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Программирование прибора для детекции результатов реакции осуществляется в соответствии с инструкцией по применению амплификатора от производителя. Учет результатов проводить в соответствии с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В положительном контрольном образце (ПКО) в каждой из PC 1-4 программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал Cy5 («Red»)) и определять значение порогового цикла Ct ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВПЧ (каналы FAM, JOE, ROX («Green», «Yellow», «Orange»)) и определять значение порогового цикла Ct ПКО для каждого сигнала.

Для ПКО в PC 5 программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал FAM («Green»)) и определять значение порогового цикла Ct ВКО;

- нарастание сигнала амплификации ДНК гена HMBS человека (канал ROX

(«Orange»)) и определять значение порогового цикла C_t ПКО.

9.2. Для отрицательного контрольного образца (ОКО) в каждой из РС 1-4 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал Cy5 («Red»)) и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «Green», «Yellow», «Orange» до C_t 35.

9.3. Для ОКО в РС 5 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал FAM («Green»)) и определять значение порогового цикла.

Так же программа не должна фиксировать нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу ROX («Orange») до C_t 32.

9.3.1. Анализируемый образец считается валидным, если для этого образца значение C_t по каналу ROX («Orange») в РС 5 меньше или равно 32.

9.3.2. Для образцов, признанных невалидными (C_t по каналу ROX («Orange») в РС 5 больше 32) необходимо провести повторный забор материала для исследования.

Внимание! Анализ исследуемого образца считается действительным только в том случае, если при анализе на валидацию образец признан валидным.

Валидация образца позволяет оценить правильность забора материала и его хранения. В случае, если эпителиальный соскоб забран неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток) или хранился в условиях, не обеспечивающих сохранность ДНК, сигнал амплификации гена HMBS человека будет заниженным, и образец будет признан невалидным.

Отрицательный результат выявления ДНК ВПЧ ВКР в таком случае может быть ложным.

9.4. Анализ результатов выявления ВПЧ ВКР.

9.4.1. В каждом исследуемом образце в РС 1-4 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал Cy5 («Red»)) и определять C_t ВКО.

9.4.2. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО) отдельно для каждой из РС 1-4. Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.4.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ ВКР, если для этого образца значение C_t в каком-либо из каналов «Green», «Yellow», «Orange» (в любой из пробирок с РС 1-4) меньше или равно 35. Соответствие результатов анализа типам ВПЧ приведено в таблице 3.

Таблица 3

пробирка	Положительный результат детекции в канале		
	FAM («Green»)	JOE («Yellow»)	ROX («Orange»)
PC 1	16 тип	39 тип	18 тип
PC 2	33 тип	56 тип	45 тип
PC 3	31 тип	58 тип	35 тип
PC 4	52 тип	59 тип	51 тип

Анализируемые образцы могут содержать ДНК ВПЧ одного или нескольких типов в любых сочетаниях.

9.4.4. Анализируемый образец считается отрицательным, не содержащим ДНК ВПЧ ВКР (не содержащим ДНК ВПЧ соответствующего типа), если для этого образца значение C_t в каком-либо из каналов FAM, JOE, ROX («Green», «Yellow», «Orange») больше 35 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.4.5. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считают недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

9.5. Количественный анализ результатов

9.5.1. Количественный анализ ДНК ВПЧ ВКР (количество копий ДНК в 1 мл транспортной среды).

Для количественного анализа рассчитать концентрацию вирусной ДНК для каждого типа ВПЧ (в коп ДНК/мл) в каждом исследуемом образце по формуле:

$$C \text{ ОБР}_k = C \text{ ПКО} \times 2^{(C_t \text{ ПКО} - C_t \text{ ОБР}_k)} \times 2^{(C_t \text{ ВКО}_k - C_t \text{ ВКО ПКО})},$$

где k – номер образца;

$C \text{ ПКО}$ – концентрация ДНК данного типа ВПЧ в ПКО, указанная во вкладыше к набору;

$C_t \text{ ПКО}$ – значения C_t данного типа ВПЧ в ПКО по каналам FAM, JOE, ROX («Green», «Yellow» или «Orange») (таблица 3);

$C_t \text{ ВКО ПКО}$ – значения C_t ВКО в ПКО по каналу Cy5 («Red») в данной РС (1, 2, 3 или 4);

$C_t \text{ ОБР}_k$ – значения C_t данного типа ВПЧ в k -ом образце по каналам FAM, JOE, ROX («Green», «Yellow» или «Orange»);

Ct ВКО_k – значения Ct ВКО в k-ом образце по каналу Cy5 («Red») в данной РС (1, 2, 3 или 4);

если эффективность амплификации (**Ea**) = 100%.

Вычислить общую концентрацию ДНК ВПЧ ВКР в образце как сумму концентраций ДНК ВПЧ ВКР всех двенадцати типов.

9.5.2. Количественный анализ ДНК ВПЧ ВКР с валидацией образца (количество копий ДНК на 100 тысяч клеток человека).

Для количественного анализа рассчитать концентрацию ДНК ВПЧ ВКР в соответствии с формулой:

$$\lg C = [(Ct \text{ HMBS} - Ct \text{ ВПЧ}) + (Ct \text{ ВКО}_{cp} \text{ HMBS} - Ct \text{ ВКО HMBS}) + (Ct \text{ ВКО ВПЧ} - Ct \text{ ВКО}_{cp} \text{ ВПЧ})] \times 0,3 + 5,3,$$

где **Ct HMBS** – Ct образца по каналу ROX («Orange») в ГРС 5;

Ct ВПЧ – Ct образца по одному из каналов «FAM», «HEX» или «ROX» («Green», «Yellow» или «Orange») в ГРС 1, 2, 3, 4;

Ct ВКО_{cp} HMBS – среднее значение Ct ВКО в ГРС 5;

Ct ВКО HMBS – Ct ВКО образца в ГРС 5;

Ct ВКО ВПЧ – Ct ВКО образца в той из ГРС 1, 2, 3, 4, где образец определен как положительный;

Ct ВКО_{cp} ВПЧ – среднее значение Ct ВКО в той из ГРС 1, 2, 3, 4, где образец определен как положительный.

Полученное значение соответствует десятичному логарифму концентрации ДНК ВПЧ ВКР, нормированной на 100 тысяч клеток человека.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание набора не допускается.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание набора не допускается.

10.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

10.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

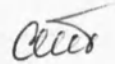
По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный», следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,

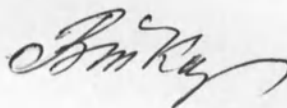
тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
ЗАО «Вектор-Бест»

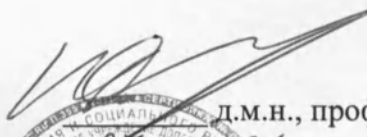
 А.В. Трухина

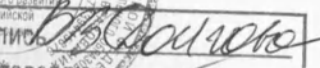
Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

«СОГЛАСОВАНО»

зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России


д.м.н., профессор Долгов В.В. 20/12 г.

Подпись: 
Удостоверяю
Специалиста по кадрам РМАПО
Подпись: _____
" ____ " ____ 20 ____ года



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
одинарца листов
И.И.И.