

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

_____ 20 ____ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

_____ 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы
человека 68, 73, 82 типов методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82» предназначен для дифференциально-выявления ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Возможно использование данного набора для количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов в клинических образцах при сочетании с набором РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный (комплект 1).

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

Набор реагентов может быть применён в клинической практике для анализа клинического материала.

Выделение ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов из клинических проб проводится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 4».

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК возбудителя инфекции гибридизационных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются 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 Taq ДНК-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 бактериальной ДНК в образце.

Учет эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК ВПЧ 68/73/82 из клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок).

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – определение 100 копий ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность определения ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

- 4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).
- 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 биологических 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.
- 4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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;
- 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 нитриловые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2,0 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);
- 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 одного из наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест ДНК-экстракция 100», согласно инструкции по применению соответствующего набора реагентов.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать положительный контрольный образец (ПКО), который является компонентом данного набора 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 в течение 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 месяц или аликвотами по 50 мкл при минус (18-24) °С в течение 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС 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 готовой реакционной смесью. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в целлофановый 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. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли) пробирок с готовой реакционной смесью для ПЦР (ГРС) пронумеровать и расположить в титиве.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая пробирка должна оставаться чистой!

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 10 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Плотнo заклеить пробирки оптической пробиркой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВПЧ 68, 73 и 82 типов и ВКО и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. 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 – 20 сек).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 и ВКО.

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 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 в системе применены гибридационные ДНК-зонды, меченные флуорофорами FAM, ROX, HEX. Для детекции следует выбирать каналы детекции «FAM», «ROX», «HEX».

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

7.9. 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 «RealBест диагностика» программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов учет результатов проводить в соответствии

и с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Сy5») и определяться значение порогового цикла C_t ВКО;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 68 типа (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 82 типа (канал «HEX») и определяться значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 73 типа (канал «ROX») и определяться значение порогового цикла C_t ПКО.

9.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Сy5») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «FAM», «HEX» и «ROX».

Если для ОКО значение C_t по каналам «FAM», «HEX» и «ROX» меньше или равно 35, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 9.9).

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Сy5») и определять C_t ВКО.

9.4. 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.

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 68, если для этого образца значение C_t по каналу «FAM» меньше или равно 35.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 82, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» меньше или равно 35.

9.7. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 73, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 35.

9.8. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение C_t по каналам «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 учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

79

9.9. 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 И ХРАНЕНИЯ 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.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест ДНК ВПЧ 8/73/82» 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, 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

Зам. директора по научной работе

ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В.Склифосовского ДЗМ»

профессор, д.м.н.



М.М. Абакумов

Handwritten mark resembling a stylized '4' or 'V'.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
семь листов

Handwritten signature in blue ink.

75

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»
М.Д. Хусаинов
_____ 2013 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы
человека 68, 73 и 82 типов методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени
«РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82» предназначен для дифференциального выявления ДНК вируса папилломы человека 68, 73 и 82 типов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Возможно использование данного набора для количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов в клинических образцах при сочетании с набором РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный (комплект 2).

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 как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия), так и планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» или их аналогами.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных по-

еодовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73 и ДНК ВПЧ 82 бридизационных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются 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 Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5' конца 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 бактериальной ДНК в образце.

Учет эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным разцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок, каждая на 10 определений;
- раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона (по 2,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – определение 100 копий ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73 и ДНК ВПЧ 82 в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность определения ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73 и ДНК ВПЧ 82 (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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 лабора-

орий, 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 минеральных 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»; 5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

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

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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 планшетного типа: «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;

– 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 нитриловые (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 Ахуген, 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 в течение 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес или аликвотами по 50 мкл при минус (18-24) °С до 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

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

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

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

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

В пробирку с реакционной смесью для ПЦР (РС) добавить 300 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 восстановления хранить реакционную смесь при температуре от 2 до 8 °C не более 2 недель.

Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить при температуре 2 до 8 °C в течение 3 месяцев.

7.2. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ПЦР должна содержать 1 ОКО и ВКО.

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой поверхности пробирок.

7.3. Во все пробирки пипеткой с наконечником с фильтром внести по 25 мкл реакционной смеси для ПЦР (РС).

7.4. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. Плотнo закрыть пробирки крышками.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации ДНК ВПЧ 68/73/82 и ВКО и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 40 сек);

– для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 20 сек);

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВПЧ 68/73/82 и ВКО:

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

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВПЧ 82 следует выбрать канал детекции «HEX» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»), «JOE»/«Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 3000/6000/Q»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВПЧ 73 следует выбрать канал детекции «ROX» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000/6000/Q»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВПЧ 68 следует выбрать канал детекции «FAM» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000/6000/Q»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).

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 «RealBест 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) должно фиксироваться:

- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 82 (канал «HEX»/«JOE»/«Yellow») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 73 (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 68 (канал «FAM»/«Green») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал Cy5 («Red»)) и определять значение порогового цикла C_t ВКО.

9.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (Cy5 («Red»)) и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange» и «FAM»/«Green».

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сиг-

а амплификации ДНК ВКО (канал Cy5 («Red»)) и определять C_t ВКО.

9.4. 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 на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 82, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» меньше или равно 35.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 73, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» / «Orange» меньше или равно 35.

9.7. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 68, если для этого образца значение C_t по каналу «FAM»/«Green» меньше или равно 35.

9.8. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение C_t по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange» и «FAM»/«Green» 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 учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.9. Если для ОКО значение C_t по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange», «FAM»/«Green» меньше или равно 35, то это свидетельствует о наличии контаминации в образце. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и устранению источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, из которых получен положительный результат. Образцы, 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. Не 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.

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 68/73/82», 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

Зам. директора по научной работе

ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В.Склифосовского ДЗМ»

профессор, д.м.н.



М.М. Абакумов



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
восемь листов

Ир.З.

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20 ____ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

_____ 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы

человека 68, 73, 82 типов методом полимеразной цепной реакции

в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82» предназначен для дифференциально-выявления ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Возможно использование данного набора для количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов в клинических образцах при сочетании с набором РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный (комплект 1).

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

Набор реагентов может быть применён в клинической практике для анализа биологического материала.

Выделение ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов из клинических проб проводится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция 00».

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

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU еления производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК возбудителя инфекции гибридационных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются 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 Taq ДНК-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 бактериальной ДНК в образце.

Учет эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК ВПЧ 68/73/82 из клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок (12 стрипов по 8 пробирок).

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – определение 100 копий ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность определения ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

- 4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).
- 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 деления 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 биологических 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.
- 4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Ленпилет, Россия; фирма Biohit, Финляндия);

- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или нитриловые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2,0 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);
- 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 одного из наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест ДНК-экстракция 100», согласно инструкции по применению соответствующего набора реагентов.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать положительный контрольный образец (ПКО), который является компонентом данного набора 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 в течение 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 месяц или аликвотами по 50 мкл при минус (18-24) °С до 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС 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 готовой реакционной смесью. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Внимание! Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в целфленовый 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.

87

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

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая пробирка должна оставаться чистой!

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 10 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Плотнo заклеить пробирки оптической пробиркой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВПЧ 68, 73 и 82 типов и ВКО и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. 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 – 20 сек).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.7. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 и ВКО.

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 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 в системе применены гибридационные ДНК-зонды, меченные флуорофорами FAM, ROX, HEX. Для детекции следует выбирать каналы детекции «FAM», «ROX», «HEX».

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

7.9. 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 «RealBест диагностика» программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов.

При использовании других амплификаторов учет результатов проводить в соответ-

и с разделом 9 данной инструкции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Сy5») и определяться значение порогового цикла C_t ВКО;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 68 типа (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 82 типа (канал «HEX») и определяться значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 73 типа (канал «ROX») и определяться значение порогового цикла C_t ПКО.

9.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Сy5») и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «FAM», «HEX» и «ROX».

Если для ОКО значение C_t по каналам «FAM», «HEX» и «ROX» меньше или равно 35, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 9.9).

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Сy5») и определять C_t ВКО.

9.4. 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.

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 68, если для этого образца значение C_t по каналу «FAM» меньше или равно 35.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 82, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» меньше или равно 35.

9.7. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 73, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 35.

9.8. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение C_t по каналам «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 учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

89

9.9. 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 И ХРАНЕНИЯ 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.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест ДНК ВПЧ 16/18/31/33/35/39/45/51/52/58/59/68/82» 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, 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

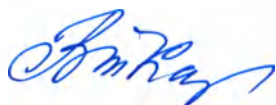
Начальник отделения

ЗАО «Вектор-Бест»

 А.В. Трухина

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

Начальник управления по науке,

инновациям и информатизации ГБОУ

ВПО НГМУ

Минздрава России



М.Ф. Осипенко



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
семь листов

пр

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2013 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы
человека 68, 73 и 82 типов методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82» предназначен для дифференциального выявления ДНК вируса папилломы человека 68, 73 и 82 типов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Возможно использование данного набора для количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов в клинических образцах при сочетании с набором «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР» генотип количественный (комплект 2).

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 как штатного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия), так и планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» или их аналогами.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73 и ДНК ВПЧ 82 олигонуклеотидных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются 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 Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5' конца 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 бактериальной ДНК в образце.

Учет эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок, каждая на 10 делений;
- раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона (по 2,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – определение 100 копий ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73 и ДНК ВПЧ 82 в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность определения ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73 и ДНК ВПЧ 82 (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов) – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

- 4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (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 лабора-

ий, 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 определенного 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 различных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности биологических 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»; 0,5-1% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

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

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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 планшетного типа: «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;

– 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 нитриловые (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, сия);
- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 мл (фирма Ахуген, США) или аналогичные;
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инстру- тария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического ма- нала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «Ре- ест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» со- сно инструкциям по применению соответствующих наборов.

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

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном де, 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 в течение 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес или аликвотами по 50 мкл при минус (18-24) °С до месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку, отобрать обходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 КО) пробирок с реакционной смесью для ПЦР (РС) и выдержать их при температуре от 18 25 °С не менее 30 минут.

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

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

После первого вскрытия упаковки срок годности РС составляет 3 месяца при темпе- ратуре хранения от 2 до 8 °С.

В пробирку с реакционной смесью для ПЦР (РС) добавить 300 мкл раствора для вос- становления (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 восстановления хранить реакционную смесь при температуре от 2 до 8 °C не более 2 недель.

Раствор для восстановления (РВ) после вскрытия флакона хранить при температуре 2 до 8 °C в течение 3 месяцев.

7.2. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ПЦР должна содержать 1 ОКО и КО.

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой поверхности пробирок.

7.3. Во все пробирки пипеткой с наконечником с фильтром внести по 25 мкл реакционной смеси для ПЦР (РС).

7.4. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. Плотнo закрыть пробирки крышками.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации ДНК ВПЧ 68/73/82 и КО и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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

- 1 стадия: 50 °C – 2 мин;
- 2 стадия: 95 °C – 2 мин;
- 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 40 сек);

– для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

- 1 стадия: 50 °C – 2 мин;
- 2 стадия: 95 °C – 2 мин;
- 3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 20 сек);

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВПЧ 68/73/82 и ВКО:

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

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВПЧ 82 следует выбрать канал экции «HEX» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»), «E»/«Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 3000/6000/Q»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВПЧ 73 следует выбрать канал экции «ROX» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 6000/Q»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВПЧ 68 следует выбрать канал экции «FAM» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 6000/Q»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).

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 «RealBest 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) должно фиксироваться:

- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 82 (канал «HEX»/«JOE»/«Yellow») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 73 (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 68 (канал «FAM»/«Green») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал Cy5 («Red»)) и определять значение порогового цикла C_t ВКО.

9.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (Cy5 («Red»)) и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange» и «FAM»/«Green».

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сиг-

на амплификации ДНК ВКО (канал Cy5 («Red»)) и определять C_t ВКО.

9.4. 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.

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 82, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» меньше или равно 35.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 73, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» / «Orange» меньше или равно 35.

9.7. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 68, если для этого образца значение C_t по каналу «FAM»/«Green» меньше или равно 35.

9.8. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение C_t по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange» и «FAM»/«Green» 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 учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.9. Если для ОКО значение C_t по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange», «FAM»/«Green» меньше или равно 35, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. 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 положительный результат. Образцы, 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.

99

овленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

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»

Син А

А.В. Трухина

Директор по производству

ЗАО «Вектор-Бест»

Burkay

В.К. Ткачев

Начальник управления по науке,

инновациям и информатизации ГБОУ

ВПО НГМУ

Минздрава России



М.Ф. Осипенко

Handwritten mark resembling a stylized 'Y' or '3'.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
восемь листов

Handwritten signature in blue ink.

ТВЕРЖДЕНА

приказом Росздравнадзора

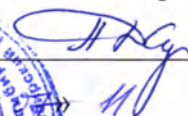
г. _____ 20 ____ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



 М.Д. Хусаинов
_____ 2013 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы
человека 68, 73, 82 типов методом полимеразной цепной реакции

в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82»

(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82» предназначен для дифференциально-
го выявления ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов, методом полимеразной
цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в ре-
жиме реального времени.

Возможно использование данного набора для количественного определения ДНК ви-
русов папилломы человека 68, 73 и 82 типов в клинических образцах при сочетании с набо-
ром РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный (комплект 1).

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

Набор реагентов может быть применён в клинической практике для анализа
клинического материала.

Выделение ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов из клинических проб
проводится с помощью наборов «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1»,
«РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест экстракция
100».

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

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: Директором

ООО ЦИРМИ  INFO@CIRMI.RU  WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU еления производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК возбудителя инфекции гибридных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются 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 Taq ДНК-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 бактериальной ДНК в образце.

Учет эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК ВПЧ 68/73/82 из клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизованная – 96 пробирок (12 пробирок по 8 пробирок).

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – определение 100 копий ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность определения ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов) – 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность по ВПЧ 68: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 47 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от больных с цитологическими признаками папилломавирусной инфекции, показали 100%

чувствительность (интервал 94%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая чувствительность по ВПЧ 73: клинические исследования, проведенные в независимых учреждениях на 51 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от больных с цитологическими признаками папилломавирусной инфекции, показали 100% чувствительность (интервал 94%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая чувствительность по ВПЧ 82: клинические исследования, проведенные в независимых учреждениях на 21 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от больных с цитологическими признаками папилломавирусной инфекции, показали 100% чувствительность (интервал 87%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность по ВПЧ 68: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 83 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от условно здоровых пациентов, больных с симптомами ИППП и от пациентов, инфицированных ВПЧ других типов, показали 100% специфичность (интервал 96%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая специфичность по ВПЧ 73: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 79 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от условно здоровых пациентов, больных с симптомами ИППП и от пациентов, инфицированных ВПЧ других типов, показали 100% специфичность (интервал 96%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая специфичность по ВПЧ 82: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 109 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от условно здоровых пациентов, больных с симптомами ИППП и от пациентов, инфицированных ВПЧ других типов, показали 100% специфичность (интервал 97%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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 определенного 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 амплификационных 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.
- 4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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;
- 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 2,0 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);

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

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического ма-
териала с помощью одного из наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-
экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» или «РеалБест
экстракция 100», согласно инструкции по применению соответствующего набора реагентов.

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

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном
состоянии, 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 в течение 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить при
температуре от 2 до 8 °С в течение 1 месяц или аликвотами по 50 мкл при минус (18-24) °С
до 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС в упаковке (не
открывая!) при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, акку-
ратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготов-
ленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с готовой реакционной смесью.
Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

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

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

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли)
пробирок с готовой реакционной смесью для ПЦР (ГРС) пронумеровать и расположить в
определенном порядке.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая
метка должна оставаться чистой!

7.3. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по мкл соответствующего раствора выделенной ДНК. Плотнo заклеить пробирки оптической ёнкой.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВПЧ 68, 73 и 82 типов и ВКО и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.6. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 мин;

2 стадия: 95 °С – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °С – 10 сек, 60 °С – 20 сек).

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.7. Выбрать канал детекции результатов амплификации ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 и ВКО.

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 68, ДНК ВПЧ 73, ДНК ВПЧ 82 в системе применены гибридационные ДНК-зонды, меченные флуорофорами FAM, ROX, HEX. Для детекции следует выбирать каналы детекции «FAM», «ROX», «HEX».

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

7.9. 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 «RealBест 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) программа должна фиксировать:

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

- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 68 типа (канал «FAM») и определяться значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 82 типа (канал «HEX») и определяться значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 73 типа (канал «ROX») и определяться значение порогового цикла C_t ПКО.

9.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) 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».

Если для ОКО значение C_t по каналам «FAM», «HEX» и «ROX» меньше или равно 35, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 9.9).

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Cy5») и определять C_t ВКО.

9.4. 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 значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 68, если для этого образца значение C_t по каналу «FAM» меньше или равно 35.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 82, если для этого образца значение C_t по каналу «HEX» меньше или равно 35.

9.7. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 73, если для этого образца значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 35.

9.8. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение C_t по каналам «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 учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения.

9.9. 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 И ХРАНЕНИЯ 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.

11. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест ДНК ВПЧ 73/82» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией при применении.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, 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

Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
восемь листов



[Handwritten signature]

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаннов

2013 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов методом полимеразной цепной реакции

в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82»

(комплект 2)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ВПЧ 68/73/82» предназначен для дифференциального выявления ДНК вируса папилломы человека 68, 73 и 82 типов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Возможно использование данного набора для количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 68, 73 и 82 типов в клинических образцах при сочетании с набором РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный (комплект 2).

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 как ротационного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия), так и планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» или их аналогами.

Комплект 2 рассчитан на проведение анализа 100 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе используемого метода регистрации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию специфичного для данного участка ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73 и ДНК ВПЧ 82 флуоресцентных ДНК-зондов, которые в ходе реакции связываются 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 Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5' конца 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 бактериальной ДНК в образце.

Учет эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК клинических проб совместно с предварительно внесенным внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пробирка (1,0 мл);
- реакционная смесь для ПЦР (РС), лиофилизированная – 10 пробирок, каждая на 10 разделений;
- раствор для восстановления (РВ) – 2 флакона (по 2,0 мл).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – определение 100 копий ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73 и ДНК ВПЧ 82 в стандартных образцах предприятия – 100%.

3.2. Специфичность определения ДНК ВПЧ 68, ДНК ВПЧ 73 и ДНК ВПЧ 82 (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов) – 100%.

3.3. Диагностическая чувствительность по ВПЧ 68: клинические исследования, проведенные в независимых учреждениях на 47 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от больных с цитологическими признаками папилломавирусной инфекции, показали 100% чувствительность (интервал 94%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая чувствительность по ВПЧ 73: клинические исследования, проведенные в независимых учреждениях на 51 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от больных с цитологическими признаками папилломавирусной инфекции, показали 100% чувствительность (интервал 94%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая чувствительность по ВПЧ 82: клинические исследования, проведенные в

х независимых учреждениях на 21 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от больных с цитологическими признаками папилломавирусной инфекции, показали 100% чувствительность (интервал 87%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.4. Диагностическая специфичность по ВПЧ 68: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 83 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от условно здоровых пациентов, больных с симптомами ИППП и от пациентов, инфицированных ВПЧ других типов, показали 100% специфичность (интервал 96%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая специфичность по ВПЧ 73: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 79 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от условно здоровых пациентов, больных с симптомами ИППП и от пациентов, инфицированных ВПЧ других типов, показали 100% специфичность (интервал 96%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

Диагностическая специфичность по ВПЧ 82: клинические исследования, проведенные в двух независимых учреждениях на 109 образцах биоматериала (соскобы со слизистой влагалища), полученных от условно здоровых пациентов, больных с симптомами ИППП и от пациентов, инфицированных ВПЧ других типов, показали 100% специфичность (интервал 97%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2Б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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 определенного 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 различных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности минеральных 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»; 0,5-1% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

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

4.10. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

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 планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «CFX96» (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;

– 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 ма-

анализа 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 в течение 2 суток.

Положительный контрольный образец (ПКО) после вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 мес или аликвотами по 50 мкл при минус (18-24) °С до 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора

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

Внимание! 1 пробирка с РС рассчитана на 10 проб.

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

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

В пробирку с реакционной смесью для ПЦР (РС) добавить 300 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 восстановления хранить реакционную смесь при температуре от 2 до 8 °С не более 2 недель.

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

7.2. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок вместимостью 0,2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли). Необходимо учитывать, что каждая индивидуальная постановка ПЦР должна содержать 1 ОКО и 1 ПКО.

Внимание! Для амплификаторов роторного типа надписи следует располагать на крышках пробирок.

Для амплификаторов планшетного типа надписи следует располагать на боковой поверхности пробирок.

7.3. Во все пробирки пипеткой с наконечником с фильтром внести по 25 мкл реакционной смеси для ПЦР (РС).

7.4. Затем в каждую пробирку внести 25 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК, используя для каждого образца индивидуальный наконечник. Плотнo закрыть пробирки крышками.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации ДНК ВПЧ 68/73/82 и ВКО и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

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

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 40 сек);

– для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»:

1 стадия: 50 °C – 2 мин;

2 стадия: 95 °C – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 сек, 60 °C – 20 сек);

Измерение флуоресценции для всех приборов проводить при 60 °C.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВПЧ 68/73/82 и ВКО:

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 процесса амплификации ДНК ВПЧ 82 следует выбрать канал детекции «HEX» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» и «ДТ-96»), «ROX»/«Yellow» (для приборов «Rotor-Gene 3000/6000/Q»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВПЧ 73 следует выбрать канал детекции «ROX» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 3000»), «Orange» (для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).

Для регистрации процесса амплификации ДНК ВПЧ 68 следует выбрать канал экции «FAM» (для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» и «Rotor-Gene 0»), «Green» (для приборов «Rotor-Gene 6000/Q»).

7.9. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролем 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 «RealBlast 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) должно фиксироваться:

- нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 82 (канал «HEX»/«JOE»/«Yellow») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 73 (канал «ROX»/«Orange») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК специфического продукта амплификации ДНК ВПЧ 68 (канал «FAM»/«Green») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал Cy5 («Red»)) и определять значение порогового цикла C_t ВКО.

9.2. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (Cy5 («Red»)) и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange» и «FAM»/«Green».

9.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал Cy5 («Red»)) и определять C_t ВКО.

9.4. 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.

9.5. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 82,

и для этого образца значение C_t по каналу «HEX»/«JOE»/«Yellow» меньше или равно 35.

9.6. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 73, и для этого образца значение C_t по каналу «ROX» / «Orange» меньше или равно 35.

9.7. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ 68, и для этого образца значение C_t по каналу «FAM»/«Green» меньше или равно 35.

9.8. Анализируемый образец считается отрицательным (не содержащим ДНК возбудителей инфекций), если для этого образца значение C_t по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange» и «FAM»/«Green» больше 35 или не определяется.

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

9.9. Если для ОКО значение C_t по каналам «HEX»/«JOE»/«Yellow», «ROX»/«Orange», «FAM»/«Green» меньше или равно 35, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. 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, из которых получен положительный результат. Образцы, 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.

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 68/73/82», 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



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
девять листов