

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПО ДНК-Технология»

Д.Ю. Трофимов

« 14 » 2016 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для определения профиля экспрессии мРНК
генов врожденного иммунитета с целью оценки локального воспаления нижних
отделов женского репродуктивного тракта
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени
(ИммуноКвантэкс С/У)**

2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Воспаление — важный симптом, сопровождающий широкий спектр заболеваний нижних отделов женского репродуктивного тракта. Оценка локальной воспалительной реакции необходима, в частности, для целей дифференциальной диагностики неспецифического вагинита и бактериального вагиноза, а также вульвовагинального кандидоза и кандидоносительства.

Воспаление, чаще всего, вызвано действием патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и реализуется через активацию различных компонентов иммунной системы. В ответ на внедрение инфекционного агента обычно развивается воспалительная реакция, а оппортунистические инфекции можно рассматривать, как своеобразный маркер дефекта защитных механизмов макроорганизма [1].

Основным, и зачастую, единственным объективным методом выявления локальной воспалительной реакции в рутинной практике в настоящее время является микроскопия мазка с подсчетом числа лейкоцитов [2]. Данный метод имеет ряд существенных ограничений в силу низкой чувствительности метода [3] и зависимости от качества приготовления мазка.

Врожденный иммунитет обеспечивает первую линию обороны и лежит в основе большинства воспалительных реакций. Большое значение имеют распознающие рецепторы врожденной иммунной системы: рецепторы макрофагов и Toll-подобные рецепторы (TLRs). После распознавания консервативных молекулярных образцов различных патогенов запускается локальный синтез цитокинов, простагландинов, хемокинов и противомикробных пептидов, что, в свою очередь, сопровождается выраженным изменением транскрипционного (экспрессионного) профиля (соотношения уровней мРНК различных генов) в иммунокомпетентных клетках. Наблюдается как повышение, так и снижение экспрессии ряда генов при развитии воспаления [4].

Изменение экспрессионного профиля может быть объективным признаком локального воспаления. При этом, оценка единичных маркеров не обладает достаточной диагностической эффективностью. Инновационным является использование метода экспрессионного профилирования для оценки состояния локального (мукозального) иммунитета по уровню мРНК ключевых

генов иммунного ответа. Данный подход широко используется, в частности, в онкологии, для стратификации опухолей молочной железы [5-8]. РНК извлекается из клеток, после чего преобразуется в кДНК, которая может быть амплифицирована и количественно оценена методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Полученный транскрипционный профиль сравнивается с транскрипционным профилем, характерным для локального воспаления. Мерой сходства исследуемого профиля с профилем, характерным для воспалительной реакции является Индекс воспаления¹ (ИВ). По величине ИВ делается заключение о наличии или отсутствии воспалительной реакции.

Для оценки транскрипционных профилей использован метод определения соотношения уровней экспрессии генов, позволяющий на практике не осуществлять нормировку на референсные гены, что существенно упрощает исследование.

Оценка профилей экспрессии проводится с помощью бинарной логистической регрессии, общее назначение которой состоит в анализе связи между несколькими независимыми переменными (называемыми также регрессорами или предикторами) и зависимой переменной. Указанная разделяющая граница называется линейным дискриминантом, так как она является линейной с точки зрения своей функции, и позволяет модели производить разделение (дискриминацию) наблюдений на два класса. В данном случае производится дискриминация на пациенток с наличием локальной воспалительной реакции и без таковой.

¹С математической точки зрения Индекс воспаления является значением граничной функции соотношений уровней представленности транскриптов ключевых генов. Общее назначение данной функции состоит в анализе связи между несколькими независимыми переменными. Значением функции является вероятность того, что полученный профиль экспрессии соответствует профилю экспрессии при воспалении. Для вычисления Индекса воспаления используется метод бинарной логистической регрессии.

Соответственно, Индекс воспаления в общем виде может быть представлен как вероятность наличия у пациентки воспаления при полученном соотношении уровня транскриптов и вычисляется по формуле (1):

$$p=1/(1+e^{-z}) \quad (1), \text{ где}$$

p – вероятность принадлежности наблюдения к определенному классу при полученном значении функции z ;

e – основание натуральных логарифмов;

z – классифицирующая дискриминантная функция вида:

$$y = a + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + \dots + b_n \cdot X_n \quad (2), \text{ где}$$

a – некоторая константа;

X_i – независимые переменные (предикторы);

b_i – коэффициенты.

Все молекулярно-генетические маркеры, используемые в клинической лабораторной диагностике воспалительных заболеваний нижних отделов женского репродуктивного тракта (транскрипты генов иммунной системы и нуклеиновые кислоты инфекционных агентов) могут быть идентифицированы в одном и том же образце с использованием единого метода – полимеразной цепной реакции, что позволяет сократить время диагностики, и снизить нагрузку на лабораторию.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для определения профиля экспрессии мРНК генов врожденного иммунитета с целью оценки локального воспаления нижних отделов женского репродуктивного тракта методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ИммуноКвантэкс С/У).

1.2. Набор реагентов ИммуноКвантэкс С/У предназначен для определения профиля экспрессии мРНК генов врожденного иммунитета в соскобе эпителиальных клеток нижних отделов женского репродуктивного тракта с целью оценки локального воспаления методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием детектирующих амплификаторов.

1.3. В качестве биологического материала используют соскобы эпителиальных клеток заднебокового свода влагалища и цервикального канала.

1.4. Набор может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода ОТ-ПЦР (полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах: температурной денатурации кДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для проведения ПЦР введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня

флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов, и измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени. Для анализа продуктов ПЦР используют детектирующий амплификатор.

ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомой кДНК, помечены флуоресцентной меткой FAM.

В таблице 1 представлен перечень выявляемых мРНК генов, канал детекции продуктов амплификации и цветовая кодировка для набора реагентов ИммуноКвантэксС/У.

Таблица 1 – Перечень выявляемых мРНК генов, каналы детекции продуктов амплификации и цветовая кодировка для набора реагентов

N пробирки в стрипе	Канал детекции				Цвет смеси /парафина*
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1	IL1B	-	-	-	Голубой/белый
2	IL10	-	-	-	Бесцветный/белый
3	IL18	-	-	-	
4	TNFA	-	-	-	
5	TLR4	-	маркер	-	
6	GATA3	-	-	-	
7	CD68	-	-	-	
8	B2M	-	-	-	

* Парафин присутствует только в пробирках со смесью для амплификации фазовки S

В определенную пробирку набора реагентов добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором как маркер определения положения стрипа в термоблоке. После прохождения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора о несоответствии.

Исследование с использованием набора состоит из следующих этапов: выделение нуклеиновых кислот (пробоподготовка); реакция обратной транскрипции; ПЦР-амплификация кДНК в режиме реального времени.

В основе оценки лежит метод сравнения индикаторных циклов исследуемых цитокинов (ΔC_p). Экспрессия мРНК цитокинов измеряется в относительных единицах и отражает соотношение уровня представленности транскриптов.

Вывод о наличии локальной воспалительной реакции основывается на значении Индекса воспаления, который вычисляется программным обеспечением детектирующего амплификатора в автоматическом режиме.

Для исключения ложноотрицательных результатов учитывается показатель амплификации кДНК гена В2М.

Праймеры и ДНК-зонды подобраны с учетом структуры генов, кодирующих мРНК цитокинов, и не дают положительного результата на матрице геномной ДНК.

2.2 Состав набора

Набор реагентов ИммуноКвантэкс С/У выпускается в следующих фасовках: стандартная (маркируется – S), для автоматизированного дозирования (маркируется – А).

Набор реагентов в стандартной фасовке рассчитан на 24 определения, в фасовке для автоматизированного дозирования на 48 определений.

По запросу потребителей допускается сокращенная комплектация смесей для амплификации с соответствующей маркировкой на упаковке.

Т а б л и ц а 2 – Вариант фасовки компонентов набора реагентов ИммуноКвантэкс С/У

Стандартная фасовка (S)		
Наименование компонентов	Количество пробирок	Номинальное количество компонента
ИммуноКвантэкс С/У Праймеры ОТ+дНТФ	1 пробирка	50 мкл
ОТ-буфер	1 пробирка	200 мкл
Обратная транскриптаза	1 пробирка	25 мкл
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Тaq-полимераза	2 пробирки	по 50 мкл
ПЦР-буфер	4 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	4 пробирки	по 1,0 мл

Положительный контрольный образец	1 пробирка	150 мкл
Количество определений, шт.	24	
Принадлежности: Крышки для стрипов	24 шт.	
Фасовка для автоматизированного дозирования (А)		
Наименование компонентов	Количество пробирок	Номинальное количество компонента
ИммуноКвантэкс C/V Праймеры ОТ+дНТФ	1 пробирка	50 мкл
ОТ-буфер	1 пробирка	200 мкл
Обратная транскриптаза	1 пробирка	25 мкл
Смесь для амплификации Стрим	2 стрипа по 8 пробирок	по 140 мкл
ПЦР-буфер Стрим	2 пробирки	по 600 мкл
Полимераза ТехноТaq МАХ	2 пробирки	по 60 мкл
Буфер для разведения ДНК	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	2 пробирки	по 100 мкл
Количество определений, шт.	48	
Принадлежности: Стрпы по 8 пробирок Крышки для стрипов	10 шт. 2 шт.	
Примечание – Приведена фасовка для использования дозирующего устройства ДТстрим (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) для дальнейшего проведения ПЦР на детектирующем амплификаторе «ДТпрайм» (384 лунки) (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). В таблице указаны номинальные количества компонентов, фасовка производится с 10-20 % (индивидуально для каждого компонента) превышением от номинального в соответствии с действующей версией производственного регламента № 41.		

2.3 Время проведения анализа – от 5 ч (с учётом пробоподготовки).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Специфичность анализа

В таблице 3 приведен перечень мРНК генов, выявляемых с помощью набора реагентов ИммуноКвантэкс С/У.

Таблица 3 – Перечень мРНК генов, выявляемых с помощью набора реагентов ИммуноКвантэкс С/У

Номер пробирки в стрипе	1	2	3	4	5	6	7	8
Наименование мРНК гена	IL1B	IL10	IL18	TNFA	TLR4	GATA3	CD68	B2M

В образцах биологического материала человека, содержащих мРНК исследуемого цитокина, после завершения реакции амплификации программное обеспечение для детектирующих амплификаторов определяет индикаторный цикл и соотношение концентраций транскриптов.

В образцах биологического материала человека, содержащих геномную ДНК человека и не содержащих мРНК исследуемых цитокинов, после завершения реакции амплификации программное обеспечение определяет отрицательный результат исследования.

Диагностическая (клиническая) специфичность выявления локальной воспалительной реакции составляет более 94 % [100,0 (94-100) %].

3.2 Чувствительность анализа

Аналитическая чувствительность набора реагентов составляет 1000 копий/мл.

Для определения уровня экспрессии всех генов количество мРНК гена B2M должно быть не менее 10000 ГЭ/мл (что соответствует показанию прибора 4,0 lg). При меньшем количестве результат определения уровня экспрессии всех генов считается недостоверным.

Диагностическая (клиническая) чувствительность выявления локальной воспалительной реакции составляет более 90 % [100,0 (90,3-100) %].

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

Этап ПЦР в реальном времени следует проводить в помещении, снабженном комплектами полуавтоматических или автоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Лабораторное оборудование и принадлежности, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях), маркированы и храниться отдельно.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Утилизировать неиспользованные реактивы, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологический материал

необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанному в паспорте к набору;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечении срока годности набора.

П р и м е ч а н и е – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов необходимо оборудование и материалы, приведенные в таблице 4.

Таблица 4 – Материалы, оборудование и реагенты

Оборудование и материалы	Вариант фасовки	
	S	A
ПЦР-бокс, ООО НПО ДНК-Технология, Россия или аналогичный	да	да
детектирующий амплификатор со специализированным программным обеспечением, например ДТпрайм, ООО НПО ДНК-Технология, Россия или аналогичный	да	да
устройство дозирующее, например ДТстрим ООО НПО ДНК-Технология, Россия или аналогичное	нет	да
устройство герметизирующее, например ДТпак ООО НПО ДНК-Технология, Россия или аналогичное	нет	да
холодильник бытовой с морозильной камерой, например Стинол, Россия или аналогичный	да	да
микроцентрифуга-вортекс, например BioSanЛатвия, или аналогичная	да	да
термостат твердотельный, поддерживающий температуру до 100°C, например «ТТ-1-«ДНК-Техн.»», ООО НПО ДНК-Технология, Россия или аналогичный	да	да
центрифуга для микропробирок, 13000 g, например Eppendorf, Германия или аналогичная	да	нет
центрифуга для микропланшет ПЦР (384 лунки), например Eppendorf, Германия или аналогичная	нет	да
дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 2,0-20 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл, например Eppendorf, Германия или аналогичные	да	нет
дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20-200 мкл, например Eppendorf, Германия или аналогичные	нет	да
наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз 100-1000 мкл, например Ахуген, США или аналогичные	да	нет
наконечники вместимостью 1,0-200 мкл, 100-1000 мкл, например Ахуген, США или аналогичные	да	да
микропланшет ПЦР (384 лунки), например 4titude LTD или аналогичный	нет	да
полимерная термопленка для запаивания микропланшета	нет	да
перчатки одноразовые, без талька	да	да
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл, например ООО НПО ДНК-Технология, Россия	да	да
ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да
комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-МЧ, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ООО НПО ДНК-Технология, ООО ДНК-Технология ТС, Россия	да	да
программное обеспечение для амплификаторов детектирующих	да	да
ini файл с параметрами анализа	да	да

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве биологического материала используют соскобы эпителиальных клеток заднебокового свода влагалища и цервикального канала.

Взятие образцов (соскобов).

Взятие соскобов проводится стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл, которые содержат 500 мкл лизирующего раствора ПРОБА-МЧ, ПРОБА-НК-ПЛЮС, ООО «НПО ДНК-Технология».

Ограничение метода – местное применение лекарственных препаратов, УЗИ вагинальным датчиком менее чем за 24 часа до исследования.

Предобработку, пробоподготовку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения ДНК из биологического материала. Рекомендуются комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-МЧ, ПРОБА-НК-ПЛЮС.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Подготовка и проведение обратной транскрипции.

7.1.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца К- по одной пробирке объёмом 0,5 мл.

7.1.2 Разморозьте содержимое пробирок ОТ-буфер и ИммуноКвантэкс С/У Праймеры ОТ + дНТФ для обратной транскрипции при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С, затем встряхните пробирки в течение 3–5 с и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.1.3 Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:

4,0 x (N+1) мкл буферного раствора ОТ-буфер,

2,0 x (N+1) мкл праймеров ИммуноКвантэкс С/У Праймеры ОТ + дНТФ,

1,0 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом К-.

7.1.4 Встряхните пробирку с ОТ-смесью на вортексе и центрифугируйте при 1000 – 3000 об/мин в течение 3–5 с.

7.1.5 Добавьте в промаркированные пробирки по 7,0 мкл ОТ-смеси.

7.1.6 Внесите в пробирки с ОТ-смесью по 33 мкл соответствующего образца НК, используя отдельные наконечники для каждого образца. В пробирку К- НК не вносится.

7.1.7 В пробирку, маркированную К-, внесите 33 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК.

Примечание – во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы НК наконечниками с аэрозольными барьерами.

7.1.8 Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 с.

7.1.9 Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.

Примечание – рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например ТТ-1-“ДНК-Техн.”, производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

7.1.10 Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

7.1.11 Добавьте к полученному препарату ДНК 60 мкл буфера для растворения из состава комплекта «ПРОБА-НК-ПЛЮС». Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 с.

7.1.12 Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка S (стандартная).

7.2.1 Промаркируйте стрипы с запечатанной парафином смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца К+ и отрицательного контрольного образца К-.

7.2.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Таq-полимеразой, затем центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- 80 x N + 10 мкл ПЦР-буфера,
- 4 x N + 0,5 мкл Taq-полимеразы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом К- и К+.

Например, необходимо проанализировать 2 образца, один К- и один К+.

Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-полимеразы для 4 образцов, т.е. $80 \times 4 + 10 = 330$ мкл ПЦР-буфера и $4 \times 4 + 0,5 = 16,5$ мкл Taq-полимеразы.

7.2.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера с Taq-полимеразой в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3–5 с.

7.2.5 Добавьте в каждую пробирку стрипов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Добавьте в каждую пробирку по одной капле минерального масла (примерно 20 мкл). Закройте крышки стрипов.

7.2.6 Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.7 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата кДНК в соответствующие стрипы для исследуемых образцов.

7.2.8 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК и обратной транскрипции (п.7.1), в стрипы, маркированные К-.

7.2.9 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца в стрипы, маркированные К+.

7.2.10 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.2.11 Установите все стрипы в амплификатор детектирующий. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

7.2.12 Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «ИммуноКвантэкс С/У.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тест «ИммуноКвантэкс С/У», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР.

7.3 Подготовка и проведение ПЦР. Фасовка А (для автоматизированного дозирования²).

7.3.1 Центрифугируйте стрипы со смесями для амплификации Стрим в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером Стрим и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Полимеразу ТехноТaq МАХ следует доставать из морозильника непосредственно перед использованием.

7.3.3 Добавьте в пробирку с ПЦР-буфером Стрим все содержимое второй пробирки с ПЦР-буфером Стрим и двух пробирок с полимеразой ТехноТaq МАХ. Закройте крышку пробирки.

7.3.4 Встряхните пробирку со смесью ПЦР-буфера Стрим и полимеразой ТехноТaq МАХ в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – смесь ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ следует готовить непосредственно перед использованием, хранение смеси не допускается.

² на примере использования дозирующего устройства ДТстрим (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) для дальнейшего проведения ПЦР на детектирующем амплификаторе.

7.3.5 Внесите аккуратно, без образования воздушных пузырей, в восемь пробирок пустого стрипа, полученного в наборе, по 140 мкл смеси ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ.

7.3.6 Промаркируйте пустые стрипы, полученные в наборе.

7.3.7 Внесите в каждую пробирку стрипов по 100 мкл буфера для разведения ДНК.

7.3.8 Добавьте аккуратно, без образования воздушных пузырей, в соответствующие пробирки стрипов с буфером для разведения ДНК по 40 мкл анализируемых образцов, К- и К+.

7.3.9 Установите стрипы со смесями для амплификации Стрим, со смесью ПЦР-буфера Стрим и полимеразы ТехноТaq МАХ, с разведенными образцами, К- и К+, а так же пустые стрипы, микропланшет для ПЦР (384 лунки) на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.

7.3.10 После завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим аккуратно переместите, не встряхивая, микропланшет в подложку герметизирующего устройства ДТпак.

7.3.11 Проведите процедуру запечатывания микропланшета термопленкой согласно инструкции к прибору ДТпак.

7.3.12 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.

7.3.13 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора «ДТпрайм» (384 лунки), заполните протокол, используя параметр «Тест» в программном обеспечении для детектирующего амплификатора, укажите идентификаторы образцов.

Примечание – Для создания теста и проведения ПЦР должен быть загружен ini-файл «ИммуноКвантэкс», поставляемый производителем.

7.3.14 Запустите программу детектирующего амплификатора, согласно руководству по эксплуатации.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляется амплификатором детектирующим автоматически.

После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице будет показан идентификатор образца, название исследования, индикаторный цикл (C_p) для каждой пробирки, указана концентрация мРНК гена В2М (lg ГЭ/мл), рассчитаны отношения уровня экспрессии генов.

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт, содержащий Индекс воспаления для каждого исследуемого образца.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.3 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

9.4 После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца, правильно расположив пробирки в термоблоке.

9.5 При анализе результатов необходимо учитывать уровень экспрессии гена В2М. Значение концентрации мРНК гена В2М должно быть в диапазоне более 4,0 lg ГЭ/мл. Если значение менее 4 lg ГЭ/мл, то результаты следует интерпретировать как недостаточное количество материала или присутствие ингибиторов в материале. В этом случае Индекс воспаления не вычисляется и может потребоваться повторное взятие биологического материала.

9.6 При наличии в исследуемом образце мРНК исследуемых генов, в строке с названием этого гена указано значение индикаторного цикла.

9.7 В случае отрицательного результата на наличие экспрессии генов (кроме IL10, TLR4) и отрицательного результата амплификации кДНК гена В2М, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца. Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате мРНК, полученном из урогенитальных соскобов; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение мРНК, либо повторный отбор биологического материала (выполняется последовательно). Для генов IL10 и TLR4 допускается отрицательный результат.

9.8 Для положительных контрольных образцов программа фиксирует положительный результат. При получении значений, выходящих за рамки допустимых значений (см. таблицу 5) результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.9 Для отрицательных контрольных образцов программа фиксирует отрицательный результат. При получении положительных значений результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

9.10 Значения Ср для положительного и отрицательного контрольных образцов.

Таблица 5 – Значения C_p для набора реагентов ИммуноКвантэкс С/У

№ пробирки	ИммуноКвантэкс С/У	
	«К+»	«К-»
1-8	28...32	отсутствует

10 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Программное обеспечение рассчитывает индексы отношения экспрессии ключевых генов, на основании которых вычисляется Индекс воспаления. Значение Индекса воспаления интерпретируется следующим образом:

Таблица 6 – Трактовка результатов исследования

Индекс воспаления, %	Интерпретация	Заключение о наличии локального воспаления
<50	Низкий	Отсутствует
50-60	Промежуточный	Не может быть исключена
>60	Высокий	Выявлена

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.3 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов комплектов реагентов, входящих в состав набора.

11.4 Смеси для амплификации, запечатанные парафином, смеси для амплификации Стрим, ПЦР-буфер, ПЦР-буфер Стрим, буфер для разведения ДНК, минеральное масло следует хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора.

Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C и их многократное размораживание.

11.5 Таq-полимеразу, полимеразу ТехноТаq МАХ, обратную транскриптазу, ОТ-буфер, праймеры ОТ+дНТФ следует хранить при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C в течение всего срока годности набора.

12 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

12.3 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

12.4 Упаковка набора относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

13 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

13.4 Срок годности набора – 9 месяцев со дня приёмки ОТК при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

14 ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Пестрикова Т. Ю., Юрасов И.В., Юрасова Е.А. Воспалительные заболевания в гинекологии. / Москва: Литтерра, 2009. 256 с.
2. Hakakha M. M., Davis J., Korst L. M., Silverman N. S. Leukorrhea and bacterial vaginosis as in-office predictors of cervical infection in high-risk women. // Obstetrics and gynecology. 2002. Vol. 100. №4. P. 808-812.
3. Lazenby G. B., Soper D. E., Nolte F. S. Correlation of leukorrhea and Trichomonas vaginalis infection. // Journal of clinical microbiology. 2013. Vol. 51. № 7. P. 2323-2327.
4. Бурменская О.В. Молекулярно-генетические маркеры иммунного ответа при воспалительных заболеваниях органов женской репродуктивной системы. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Москва, 2014. 249 с.
5. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours // Nature. 2000.Vol. 406 (6797).P. 747-752.
6. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // Science. 1995. Vol. 270 (5235). P. 467-470.
7. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications // Proc Natl AcadSci U S A.2001.Vol. 98 (19). P. 10869-10874.
8. Sorlie T., Tibshirani R., Parker J. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. // Proc Natl AcadSci U S A. 2003. Vol. 100 (14). P. 8418-8423.

Символы, используемые при маркировке набора

	Только для invitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света

По вопросам, касающимся качества наборов реагентов ИммуноКвантэкс С/У следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6.

тел./факс +7 (495) 980-45-55, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»: http://www.dna-technology.ru/customer_support/

Ведущий научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология»,
д.б.н.



О.В. Бурменская

« 11 » 01 2016г.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НЦАГиП.
им. В.И. Кулакова» Минздрава России,
академик РАМН, профессор



Г.Т. Сухих

« 20 » 01 2016г.

Инструкция №004т-2

Прошито и пронумеровано 24 листов

Директор ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова»

Минздрава России,

академик РАН, профессор



Г.Т. Сухих

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НПО ДНК-Технология»

Д.Ю. Трофимов

2015 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения профиля экспрессии мРНК
генов врожденного иммунитета с целью оценки локального воспаления нижних
отделов женского репродуктивного тракта
методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени
ИммуноКвантэкс С/У

2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Воспаление – важный симптом, сопровождающий широкий спектр заболеваний нижних отделов женского репродуктивного тракта. Оценка локальной воспалительной реакции необходима, в частности, для целей дифференциальной диагностики неспецифического вагинита и бактериального вагиноза, а также вульвовагинального кандидоза и кандидоносительства.

Воспаление, чаще всего, вызвано действием патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и реализуется через активацию различных компонентов иммунной системы. В ответ на внедрение инфекционного агента обычно развивается воспалительная реакция, а оппортунистические инфекции можно рассматривать, как своеобразный маркер дефекта защитных механизмов макроорганизма [1].

Основным, и зачастую, единственным объективным методом выявления локальной воспалительной реакции в рутинной практике в настоящее время является микроскопия мазка с подсчетом числа лейкоцитов [2]. Данный метод имеет ряд существенных ограничений в силу низкой чувствительности метода [3] и зависимости от качества приготовления мазка.

Врожденный иммунитет обеспечивает первую линию обороны и лежит в основе большинства воспалительных реакций. Большое значение имеют распознающие рецепторы врожденной иммунной системы: рецепторы макрофагов и Toll-подобные рецепторы (TLRs). После распознавания консервативных молекулярных образцов различных патогенов запускается локальный синтез цитокинов, простагландинов, хемокинов и противомикробных пептидов, что, в свою очередь, сопровождается выраженным изменением транскрипционного профиля иммунокомпетентных клеток. Наблюдается как повышение, так и снижение экспрессии ряда генов при развитии воспаления [4].

Изменение экспрессионного профиля может быть объективным признаком локального воспаления. При этом, использование единичных маркеров не обладает достаточной диагностической эффективностью. Инновационным является использование метода экспрессионного профилирования для оценки состояния локального (мукозального) иммунитета по уровню мРНК ключевых генов иммунного ответа. Данный подход широко используется, в частности, в

онкологии, для стратификации опухолей молочной железы [5-8]. РНК извлекается из клеток, после чего преобразуется в кДНК, которая может быть амплифицирована и количественно оценена методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Полученный транскрипционный профиль сравнивается с транскрипционным профилем, характерным для локального воспаления. Мерой сходства исследуемого профиля с профилем, характерным для воспалительной реакции является Индекс воспаления (ИВ). По величине ИВ делается заключение о наличии или отсутствии воспалительной реакции.

Для оценки транскрипционных профилей использован метод определения соотношения уровней экспрессии генов, позволяющий на практике не осуществлять нормировку на референсные гены, что существенно упрощает исследование.

Все молекулярно-генетические маркеры, используемые в клинической лабораторной диагностике воспалительных заболеваний нижних отделов женского репродуктивного тракта (транскрипты генов иммунной системы и нуклеиновые кислоты инфекционных агентов) могут быть идентифицированы в одном и том же образце с использованием единого метода – полимеразной цепной реакцией, что позволяет сократить время диагностики, и снизить нагрузку на лабораторию.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Настоящая инструкция распространяется на Набор реагентов для определения профиля экспрессии мРНК генов врожденного иммунитета с целью оценки локального воспаления нижних отделов женского репродуктивного тракта методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени ИммуноКвантэкс С/У.

1.2. Набор реагентов ИммуноКвантэкс С/У предназначен для определения профиля экспрессии мРНК генов врожденного иммунитета в соскобе эпителиальных клеток нижних отделов женского репродуктивного тракта с целью оценки локального воспаления методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием детектирующих амплификаторов.

1.3. В качестве биологического материала используют соскобы эпителиальных клеток из заднебоковых сводов влагалища и цервикального канала.

1.4. Набор может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах: температурной денатурации кДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров Таq-полимеразой.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв,

разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В реакционную смесь для проведения ПЦР введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени. Для анализа продуктов ПЦР используют детектирующий амплификатор.

ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомой кДНК, помечены флуоресцентной меткой FAM.

В таблице 1 представлен перечень выявляемых мРНК генов, канал детекции продуктов амплификации и цветовая кодировка для набора реагентов ИммуноКвантэксС/У.

Таблица 1 – Перечень выявляемых мРНК генов, каналы детекции продуктов амплификации и цветовая кодировка для набора реагентов

N пробирки в стрипе	Канал детекции				Цвет смеси /парафина*
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1	IL1B	-	-	-	Бесцветный/белый
2	IL10	-	-	-	
3	IL18	-	-	-	
4	TNFA	-	-	-	
5	TLR4	-	маркер	-	
6	GATA3	-	-	-	
7	CD68	-	-	-	
8	B2M	-	-	-	
* Парафин присутствует только в пробирках со смесью для амплификации фасовки S					

В определенную пробирку набора реагентов добавлен олигонуклеотид с флуоресцентной меткой Rox – «Маркер». Он используется прибором как маркер определения положения стрипа в планшете. После прохождения амплификации программное обеспечение детектирующего амплификатора сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера, и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора о несоответствии.

Исследование с использованием набора состоит из следующих этапов: выделение нуклеиновых кислот (пробоподготовка); реакция обратной транскрипции; ПЦР-амплификация кДНК в режиме реального времени.

В основе оценки лежит метод сравнения индикаторных циклов исследуемых цитокинов (ΔC_p). Экспрессия мРНК цитокинов измеряется в относительных единицах и отражает соотношение уровня представленности транскриптов.

Заключение о наличии локальной воспалительной реакции проводится на основании расчета значения Индекса воспаления¹, проводимом программным обеспечением детектирующего амплификатора в автоматическом режиме.

Для оценки валидности полученных результатов учитывается показатель амплификации кДНК референсного гена B2M.

Праймеры и ДНК-зонды подобраны с учетом структуры генов, кодирующих мРНК цитокинов, и не дают положительного результата на матрице геномной ДНК.

¹с математической точки зрения Индекс воспаления является значением граничной функции соотношений уровней представленности транскриптов ключевых генов. Общее назначение данной функции состоит в анализе связи между несколькими независимыми переменными. Значением функции является вероятность того, что полученный профиль экспрессии соответствует профилю экспрессии при воспалении. Для вычисления Индекса воспаления используется метод бинарной логистической регрессии.

2.2 Состав набора

Набор реагентов ИммуноКвантэкс С/У выпускается в следующих фасовках: стандартная (маркируется – S), для автоматизированного дозирования (маркируется – А).

Набор реагентов в стандартной фасовке рассчитан на 24 определения, в фасовке для автоматизированного дозирования на 48 определений.

По запросу потребителей допускается комплектация сокращенного наименования смесей для амплификации с соответствующей маркировкой на упаковке.

Таблица 2–Вариант фасовки компонентов набора реагентов ИммуноКвантэкс С/У

Стандартная фасовка (S)		
Наименование компонентов	Количество пробирок	Номинальное количество компонента
ИммуноКвантэкс С/V Праймеры ОТ+дНТФ	1 пробирка	50 мкл
ОТ-буфер	1 пробирка	200 мкл
Обратная транскриптаза	1 пробирка	25 мкл
Смеси для амплификации, запечатанные парафином	24 стрипа по 8 пробирок	по 20 мкл
Taq-полимераза	2 пробирка	по 50 мкл
ПЦР-буфер	4 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	1 пробирка	150 мкл
Количество определений, шт.	24	
Принадлежности: Крышки для стрипов	24 шт.	
Фасовка для автоматизированного дозирования (А)		
Наименование компонентов	Количество пробирок	Номинальное количество компонента
ИммуноКвантэкс С/V Праймеры ОТ+дНТФ	1 пробирка	50 мкл
ОТ-буфер	1 пробирка	200 мкл
Обратная транскриптаза	1 пробирка	25 мкл
Смесь для амплификации Стрим	2 стрипа по 8 пробирок	по 140 мкл
ПЦР-буфер Стрим	2 пробирки	по 600 мкл
Полимераза ТехноTaq MAX	2 пробирки	по 60 мкл
Буфер для разведения ДНК	4 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	2 пробирки	по 100 мкл

Количество определений, шт.	48
Принадлежности: Стрпы по 8 пробирок Крышки для стрипов	10 шт. 2 шт.
Примечание – Приведена фасовка для использования дозирующего устройства ДТстрим (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) для дальнейшего проведения ПЦР на детектирующем амплификаторе «ДТпрайм» (384 лунки) (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). В таблице указаны номинальные количества компонентов, фасовка производится с 10-20 % (индивидуально для каждого компонента) превышением от номинального в соответствии с действующей версией производственного регламента № 41.	

2.2. Время проведения анализа – от 5 ч (с учётом пробоподготовки).

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1 Специфичность анализа

В таблице 3 приведен перечень мРНК генов, выявляемых с помощью набора реагентов ИммуноКвантэкс С/У.

Таблица 3 – Перечень мРНК генов, выявляемых с помощью набора реагентов ИммуноКвантэкс С/У.

Номер пробирки в стрипе	1	2	3	4	5	6	7	8
Наименование мРНК гена	IL1B	IL10	IL18	TNFA	TLR4	GATA3	CD68	B2M

В образцах биологического материала человека, содержащих мРНК исследуемого цитокина, после завершения реакции амплификации программное обеспечение для детектирующих амплификаторов определяет индикаторный цикл и соотношение (индекс) концентраций транскриптов.

В образцах биологического материала человека, содержащих геномную ДНК человека и не содержащих мРНК исследуемых цитокинов, после завершения реакции амплификации программное обеспечение определяет отрицательный результат исследования.

Диагностическая (клиническая) специфичность выявления локальной воспалительной реакции составляет 96,8 (88,8-99,6) %.

3.2 Чувствительность анализа

Аналитическая чувствительность набора реагентов составляет 1000 копий/мл.

Для определения уровня экспрессии всех генов количество мРНК гена B2M должно быть не менее 10000 ГЭ/мл (что соответствует показанию прибора 4,0 lg). При меньшем количестве результат определения уровня экспрессии всех генов считается недостоверным.

Диагностическая (клиническая) чувствительность выявления локальной воспалительной реакции составляет 100,0 (90,7-100) %.

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

Использовать только новые наконечники и пробирки.

Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

Этап ПЦР в реальном времени следует проводить в помещении, снабженном комплектами полуавтоматических или автоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Лабораторное оборудование и принадлежности, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях), маркированы и храниться отдельно.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Утилизировать неиспользованные реактивы, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты и биологический материал

необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности набора.

П р и м е ч а н и е – Набор реагентов **не содержит** материалы биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов необходимо оборудование и материалы, приведенные в таблице 4.

Т а б л и ц а 4 – Материалы, оборудование и реагенты

Оборудование и материалы	Вариант фасовки	
	S	A
ПЦР-бокс	да	да
детектирующий амплификатор «ДТпрайм»	да	да
устройство дозирующее ДТстрим	нет	да
устройство герметизирующее, например ДТпак	нет	да
холодильник бытовой с морозильной камерой	нет	да
микроцентрифуга-вортекс	да	да
центрифуга для микропланшет ПЦР (384 лунки)	нет	да
дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 2,0-20 мкл, 10-100 мкл	да	нет
дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20-200 мкл	нет	да
наконечники вместимостью 1,0-20 мкл с фильтром, 100-1000 мкл	да	нет
наконечники вместимостью 1,0-200 мкл, 100-1000 мкл	да	да
микропланшет ПЦР (384 лунки)	нет	да
полимерная термопленка для запаивания микропланшета	нет	да
штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл	да	да
ёмкость с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов	да	да
комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-МЧ, ПРОБА-НК-ПЛЮС)	да	да
программное обеспечение для амплификаторов детектирующих	да	да
ini файл с параметрами анализа «ИммуноКвантэкс V/C»	да	да

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

В качестве биологического материала используют соскобы эпителиальных клеток из заднебоковых сводов влагалища и цервикального канала.

Ограничение метода – местное применение лекарственных препаратов, УЗИ вагинальным датчиком менее чем за 24 часа до исследования.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения ДНК из биологического материала. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-МЧ, ПРОБА-НК-ПЛЮС.

Взятие образцов (соскобов).

Взятие соскобов проводится стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл, которые содержат 500 мкл лизирующего раствора ПРОБА-МЧ, ПРОБА-НК-ПЛЮС ООО «НПО ДНК-Технология».

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1 Подготовка и проведение обратной транскрипции.

7.1.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца К- по одной пробирке объёмом 0,5 мл.

7.1.2 Разморозьте содержимое пробирок ОТ-буфер и ИммуноКвантэкс С/У Праймеры ОТ + дНТФ для обратной транскрипции при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С, затем встряхните пробирки в течение 3–5 с и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.1.3 Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:

4,0 x (N+1) мкл буферного раствора ОТ-буфер,

2,0 x (N+1) мкл праймеров ИммуноКвантэкс С/У Праймеры ОТ + дНТФ,

1,0 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом К-.

7.1.4 Встряхните пробирку на вортексе и центрифугируйте при 1000 – 3000 об/мин в течение 3–5 с.

7.1.5 Добавьте в промаркированные пробирки по 7,0 мкл ОТ-смеси.

7.1.6 Внесите в пробирки с ОТ-смесью по 33 мкл соответствующего образца НК, используя отдельные наконечники для каждого образца. В пробирку К- НК не вносится.

7.1.7 В пробирку, маркированную К-, внесите 33 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК.

Примечание – во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы НК наконечниками с аэрозольными барьерами.

7.1.8 Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 с.

7.1.9 Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.

Примечание – рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например «Гном» производства ООО «НПО ДНК-Технология»)

7.1.10 Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с.

7.1.11 Добавьте к полученному препарату ДНК 60 мкл буфера для растворения из состава комплекта «ПРОБА-НК-ПЛЮС». Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 с.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

7.2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции (стандартная фасовка).

7.2.1 Промаркируйте стрипы с запечатанной парафином смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца К+ и отрицательного контрольного образца К-.

7.2.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Таq-полимеразой, затем центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- $80 \times N + 10$ мкл ПЦР-буфера,
- $4 \times N + 0,5$ мкл Таq-полимеразы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом К- и К+.

Например, необходимо проанализировать 2 образца, один К- и один К+.

Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Таq-полимеразы для 4 образцов, т.е. $80 \times 4 + 10 = 330$ мкл ПЦР-буфера и $4 \times 4 + 0,5 = 16,5$ мкл Таq-полимеразы.

7.2.4 Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера с Таq-полимеразой в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3–5 с.

7.2.5 Добавьте в каждую пробирку стрипов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Таq-полимеразой. Добавьте в каждую пробирку по одной капле минерального масла (примерно 20 мкл). Закройте крышки стрипов.

7.2.6 Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только тех стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

7.2.7 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата кДНК в соответствующие стрипованные пробирки для исследуемых образцов.

7.2.8 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК и обратной транскрипции (п.7), в стрипованные пробирки, маркированные К-.

7.2.9 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца в стрипованные пробирки, маркированные К+.

7.2.10 Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.

7.2.11 Установите все стрипы в амплификатор детектирующий. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

7.2.12 Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «ИммуноКвантэкс С/У.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тест «ИммуноКвантэкс С/У», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой) и проведите ПЦР.

7.3 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции (фасовка для автоматизированного дозирования).

7.3.1 Приготовьте смесь ПЦР-буфера Стрим с полимеразой ТехноТaq МАХ.

В пробирку с ПЦР-буфером Стрим добавьте весь объем пробирки с Тaq-полимеразой.

7.3.2 Встряхните пробирку со смесью в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.3.3 Внесите в восемь пробирок нового пустого стрипа по 140 мкл полученной смеси.

7.3.4 Центрифугируйте стрип на микроцентрифуге.

7.3.5 Поместить стрип на рабочий стол APC в соответствии со схемой на вкладыше.

7.3.6 Центрифугировать стрипы со смесями для амплификации Стрим.

7.3.7 Поместить стрипы со смесями для амплификации Стрим на рабочий стол ДТстрим в соответствии со схемой на вкладыше.

7.3.8 Открыть стрипы со смесью для амплификации.

7.3.9 Промаркируйте пустые стрипы для выделенного из образцов препарата кДНК (по одной пробирке стрипа для каждого образца кДНК, отрицательного контрольного образца, положительного контрольного образца).

7.3.10 Внесите в пустые стрипы по 120 мкл препарата кДНК, отрицательного контрольного образца, положительного контрольного образца.

ВНИМАНИЕ! Препарат кДНК следует развести: 30 мкл образца ДНК + 90 мкл буфера для разведения ДНК. Таким же образом необходимо развести положительный контрольный образец.

7.3.11 Центрифугируйте стрипы с препаратами кДНК на центрифуге.

7.3.12 Поставьте два новых пустых стрипа на рабочий стол ДТстрим.

7.3.13 Запустите программу раскапывания.

7.3.14 Запечатайте планшет на 384 лунки на ламинаторе ДТпак в соответствии с инструкцией к прибору.

7.3.15 Поместите планшет на 384 лунки в детектирующий амплификатор.

7.3.16 Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini-файл. При последующих постановках добавьте в протокол тест «ИммуноКвантэкс С/У», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР.

8 РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляется амплификатором детектирующим автоматически.

После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице будет показан идентификатор образца, название исследования, индикаторный цикл (Cp) по каждому исследованию, указана концентрация РНК референсного гена (lg ГЭ/мл), рассчитаны отношения уровня экспрессии генов.

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт, содержащий оценку вероятности локальной воспалительной реакции для каждого исследуемого образца.

9 УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1 Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

9.2 После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо

повторить исследование данного образца, правильно расположив пробирки в термоблоке.

9.3 В результатах анализа необходимо учитывать уровень экспрессии гена В2М. Значение концентрации мРНК гена В2М должно быть в диапазоне более 4,0 lg ГЭ/мл. Если значение менее 4 lg ГЭ/мл, то результаты следует интерпретировать как недостаточное количество материала или присутствие ингибиторов в материале. В этом случае может потребоваться повторное взятие клинического материала.

9.4 При наличии в исследуемом образце мРНК исследуемых генов, в строке с названием этого гена указано значение индикаторного цикла.

9.5 В случае отрицательного результата на наличие экспрессии генов (кроме IL10 TLR4) и отрицательного результата амплификации кДНКреференсного гена, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца. Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате мРНК, полученном из урогенитальных соскобов; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение мРНК, либо повторный отбор биологического материала (выполняется последовательно). Для генов IL10 и TLR4 допускается отрицательный результат.

9.6 Для положительных контрольных образцов программа фиксирует положительный результат. При получении значений, выходящих за рамки допустимых значений (см. таблицу 5) результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.

9.7 Для отрицательных контрольных образцов программа фиксирует отрицательный результат. При получении положительных значений результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

9.8 Значения Ср для положительного и отрицательного контрольных образцов.

Таблица 5 – Значения Ср для набора реагентов ИммуноКвантэкс С/У

№ пробирки	ИммуноКвантэкс С/У	
	«К+»	«К-»
1-8	28...32	отсутствует

10

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Программное обеспечение рассчитывает индексы отношения экспрессии ключевых генов, на основании которых вычисляется Индекс воспаления. Значение индекса воспаления интерпретируется следующим образом:

Таблица 6 – Трактовка результатов исследования

Индекс воспаления, %	Интерпретация	Заключение о наличие локальной воспалительной реакции
<50	Низкий	Отсутствует
50-60	Промежуточный	Не может быть исключена
>60	Высокий	Выявлена

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1 Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов комплектов реагентов, входящих в состав набора.

11.2 Смеси для амплификации, запечатанные парафином, смеси для амплификации Стрим, ПЦР-буфер, ПЦР-буфер Стрим, буфер для разведения ДНК, минеральное масло следует хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора.

Допускается хранение ПЦР-буфера и минерального масла при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С и их многократное размораживание.

11.3 Таq-полимеразу, полимеразу ТехноТаq МАХ, обратную транскриптазу, ОТ-буфер, праймеры ОТ+дНТФ следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора.

12 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

12.1 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

12.2 Упаковка набора относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

13 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

13.2 Срок годности набора – 9 месяцев со дня приёмки ОТК при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Пестрикова Т. Ю., Юрасов И.В., Юрасова Е.А. Воспалительные заболевания в гинекологии. / Москва: Литтерра, 2009. 256 с.
2. Hakakha M. M., Davis J., Korst L. M., Silverman N. S. Leukorrhea and bacterial vaginosis as in-office predictors of cervical infection in high-risk women. // Obstetrics and gynecology. 2002. Vol. 100. №4. P. 808-812.
3. Lazenby G. B., Soper D. E., Nolte F. S. Correlation of leukorrhea and Trichomonas vaginalis infection. // Journal of clinical microbiology. 2013. Vol. 51. № 7. P. 2323-2327.
4. Бурменская О.В. Молекулярно-генетические маркеры иммунного ответа при воспалительных заболеваниях органов женской репродуктивной системы. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Москва, 2014. 249 с.
5. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours // Nature. 2000.Vol. 406 (6797).P. 747-752.
6. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // Science. 1995. Vol. 270 (5235). P. 467-470.
7. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications // Proc Natl AcadSci U S A.2001.Vol. 98 (19). P. 10869-10874.
8. Sorlie T., Tibshirani R., Parker J. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. // Proc Natl AcadSci U S A. 2003. Vol. 100 (14). P. 8418-8423.

Символы, используемые при маркировке набора

	Только для invitro диагностики
	Температурный диапазон
	Количество определений
	Годен до
	Серия набора
	Дата производства
	Содержит инструкцию по применению
	Каталожный номер
	Адрес производителя
	Не допускается воздействие солнечного света

По вопросам, касающимся качества наборов ИммуноКвантэкс С/У следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 125 ж, к.6, а/я 181,

тел./факс +7 (495) 980-45-55, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»: www.dna-technology.ru/support

Ведущий научный сотрудник
ООО «НПФ ДНК-Технология»,
д.б.н.



О.В. Бурменская

« 14 » 10 2015г.

СОГЛАСОВАНО

Директор ФГБУ «НЦАГиП.
им. В.И. Кулакова» Минздрава России,
академик РАН, профессор



« 16 » 10 2015г.

Инструкция №004м.

Прошито и пронумеровано 24 листов

Директор ФГБУ «НЦАГиП им.
В.И. Кулакова» Минздрава России,
академик РАМН, профессор

Г.Т. Сухих



ВЕРЖДЕНА

УТВЕРЖДАЮ

Приказом Росздравнадзора

Генеральный директор

от _____ 201__ г № _____

ЗАО «НПО ДНК-Технология»

Д.Ю.Трофимов

2013 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для оценки локальной воспалительной реакции
влагалища методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени
(Экспрессия генов. Воспаление влагалища)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1. Набор предназначен для оценки локальной воспалительной реакции во влагалище по профилю экспрессии мРНК генов человека в биологическом материале человека методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием детектирующих амплификаторов.
- 1.2. Набор может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

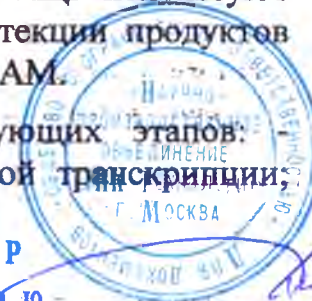
Принцип метода основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации кДНК, заключающейся в повторяющихся циклах: температурной денатурации кДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров Таq-полимеразой.

В реакционную смесь для проведения ПЦР введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации в режиме реального времени. Для анализа продуктов ПЦР используют детектирующий амплификатор. ДНК-зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомой кДНК, помечены флуоресцентными метками FAM.

Исследование с использованием набора состоит из следующих этапов: выделение нуклеиновых кислот (пробоподготовка); реакция обратной транскрипции; ПЦР-амплификация кДНК в режиме реального времени.

ГЕН. ДИРЕКТОР

ДМИТРОВСКИЙ В.Ю.



В основе оценки лежит метод сравнения индикаторных циклов исследуемых генов (метод дельта Си-пи (ΔC_p)). Экспрессия мРНК цитокинов измеряется в относительных единицах и отражает соотношение уровня представленности транскриптов.

Заключение о вероятности локальной воспалительной реакции проводится на основании расчета значения канонической линейной дискриминантой функции, проводимом программным обеспечением детектирующего амплификатора в автоматическом режиме.

Для исключения ложноотрицательных результатов учитывается показатель амплификации кДНК референсного гена B2M.

Праймеры и ДНК-зонды подобраны с учетом структуры генов, кодирующих мРНК цитокинов, и не дают положительного результата на матрице геномной ДНК.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смещение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

2.2. Состав набора

Набор выпускается в стандартных комплектациях, также допускается оптовая фасовка реагентов для крупных лабораторий, фасовка для автоматических раскапывающих станций, в т.ч. для использования в пакетных исследованиях. В состав набора входят следующие компоненты: специфичные для определяемых генов смеси для амплификации, положительные контрольные образцы и вспомогательные реагенты.

Набор в стандартных комплектациях рассчитан на 24 определения. По запросу потребителей возможна фасовка, рассчитанная на другое количество определений. Полный перечень генов, определяемых с помощью набора, приведен в таблице 1. По запросу потребителей возможна сокращенная комплектация набора. Варианты фасовок наборы приведены в таблице 2.

Таблица 1. ПЕРЕЧЕНЬ ГЕНОВ, ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ С ПОМОЩЬЮ НАБОРА

N пробирки в стрипе	Канал детекции				цвет смеси для амплификации
	Fam	Hex	Rox	Cy5	
1	IL1B	-	-	-	голубой
2	IL10	-	-	-	
3	IL18	-	-	-	
4	TNFA	-	-	-	
5	TLR4	-	маркер	-	
6	GATA3	-	-	-	
7	CD68	-	-	-	
8	B2M	-	-	-	

Таблица 2. ВАРИАНТЫ ФАСОВОК РЕАГЕНТОВ

Реагент	Стандартная комплектация (на 24 определения)	Сокращенная комплектация (фасовка на одно наименование на 48 определений)*	Фасовка для автоматических раскапывающих станций, в т.ч. для пакетных
---------	--	--	---

			исследований**
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	24 стрипа (по 8 пробирок) по 20 мкл	48 пробирок или 6 стрипов по 8 пробирок	отсутствует
Смесь для амплификации Стрим	отсутствует	отсутствует	1 стрип (по 8 пробирок) по 140 мкл
ОТ-буфер	1 пробирка (200 мкл)	1 пробирка (200 мкл)	1 пробирка (200 мкл)
Обратная транскриптаза	1 пробирка (25 мкл)	1 пробирка (25 мкл)	1 пробирка (25 мкл)
Праймеры ОТ+дНТФ	1 пробирка (50 мкл)	1 пробирка (50 мкл)	1 пробирка (50 мкл)
ПЦР-буфер	4 пробирки (по 500 мкл)***	500 мкл 1 пробирка***	отсутствует
ПЦР-буфер Стрим	отсутствует	отсутствует	1 пробирка (1280 мкл)
Тaq-АТ-полимераза Или	отсутствует	отсутствует	1 пробирка (120 мкл)
Тaq-полимераза Или	2 пробирки (по 50 мкл)	1 пробирка (50 мкл)	отсутствует
раствор Тaq-полимеразы	4 пробирки (по 500 мкл)	1 пробирка (500 мкл)	отсутствует
Минеральное масло	4 пробирки (1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)	отсутствует
Буфер для разведения ДНК	отсутствует	отсутствует	3 пробирки (по 1080 мкл)
Положительный контрольный образец	1 пробирка (300 мкл)	1 пробирка (75 мкл)	1 пробирка 60 мкл
Отрицательный контрольный образец (по запросу)	1 пробирка (300 мкл)	1 пробирка (75 мкл)	1 пробирка 60 мкл

* - по запросу потребителей допускается комплектация сокращенного количества смесей для амплификации (менее 8 наименований) с соответствующей маркировкой упаковки,

** - приведена фасовка для раскапывания с использованием автоматической раскапывающей станции ДТстрим (ООО «НПО ДНК-Технология») для дальнейшего проведения ПЦР на амплификаторе ДТпрайм (на 384 лунки) (ООО «НПО ДНК-Технология»).

*** - включен в наборы с Тaq-полимеразой.

2.3. Время проведения анализа – от 5 ч (с учётом пробоподготовки).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Специфичность анализа

В образцах биологического материала человека, содержащих мРНК исследуемого цитокина, после завершения реакции амплификации программное обеспечение для детектирующих амплификаторов определяет индикаторный цикл и соотношение (индекс) концентраций транскриптов.

В образцах биологического материала человека, содержащих геномную ДНК человека и не содержащих мРНК исследуемых цитокинов, после завершения

акции амплификации программное обеспечение определяет отрицательный результат исследования.

2. Чувствительность анализа

Чувствительность анализа - 1 000 копий/мл.

Для исключения ложноотрицательных результатов учитывается показатель амплификации мРНК референсного гена В2М. В2М - высокоэкспрессируемый ген во влажных мазках (средняя копийность $1,0 \cdot 10^6$ копий/мл). Количество мРНК гена В2М должно быть не менее $1,0 \cdot 10^4$ копий/мл. При меньшем количестве результат определения уровня экспрессии всех генов считается недостоверным.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора - класс 2Б (п.9.3.3 Приказа Минздрава России от 06.06.2012 N 4н).

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 529205-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор. Удалять неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» и МУ 287-113 по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий со специализированным программным обеспечением;
- автоматическая распыляющая станция (при использовании фасовки для АСР);
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуры 50 °C и 65 °C;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;

пробирки вместимостью 200мкл стрипованные по 8шт. (при использовании фасовки для АСР);

- крышки для пробирок стрипованных (при использовании фасовки для АСР);
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- контейнер с дезинфицирующим раствором для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- транспортная среда для биопроб (производство ООО «НПО ДНК-Технология»)
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-МЧ, ПРОБА-НК-ПЛЮС производства ООО «НПО ДНК-Технология»).
- ini файл с параметрами анализа.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для исследования у женщин используют соскобы эпителиальных клеток из влагалища (заднебоковые своды).

Ограничение метода – применение местных противовоспалительных препаратов, УЗИ вагинальным датчиком менее чем за 24 часа до исследования.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения ДНК из биологического материала. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-МЧ, ПРОБА-НК-ПЛЮС.

6.1. Взятие образцов образцов урогенитальных соскобов

Взятие соскобов из влагалища проводится стерильным одноразовым зондом в пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл, которые содержат 500 мкл лизирующего раствора ПРОБА-МЧ, ПРОБА-НК-ПЛЮС ООО «НПО ДНК-Технология».

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка и проведение обратной транскрипции.

7.1.1. Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-» по одной пробирке объёмом 0,5 мл.

7.1.2. Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ + дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (18–25 °С), затем встряхните пробирки в течение 3–5 сек и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3–5 сек на микроцентрифуге/вортексе.

приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:

- 4,0 x (N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»,
- 2,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ + дНТФ»,
- 1,0 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-».

7.1.4. Встряхните пробирку на вортексе и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.1.5. Добавьте в промаркированные пробирки по 7,0 мкл ОТ-смеси.

7.1.6. Внесите в пробирки с ОТ-смесью по 33 мкл соответствующего образца НК, используя отдельные наконечники для каждого образца. В пробирку «К-» НК не вносится.

7.1.7. В пробирку, маркированную «К-», внесите 33 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК.

Примечание: во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы НК наконечниками с аэрозольными барьерами.

7.1.8. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.1.9. Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °C в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °C в течение 5 мин.

Примечание: рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например «Гном» производства ООО «НПО ДНК-Технология»)

7.1.10. Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

7.1.11. Добавьте к полученному препарату ДНК 60 мкл буфера для растворения из состава комплекта «ПРОБА-НК-ПЛЮС». Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

7.2. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции (**стандартная фасовка**).

7.2.1. Промаркируйте стрипы с запечатанной парафином смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца («К+») и отрицательного контрольного образца («К-»).

7.2.2. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Taq-полимеразой, затем центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

7.2.3. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:

- 80xN+10 мкл ПЦР-буфера,
- 4xN+0,5 мкл Taq-полимеразы,

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+».

Например, необходимо проанализировать 2 образца, один «К-» и один «К+». Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-полимеразы для 4 образцов, т.е. $80 \times 4 + 10 = 330$ мкл ПЦР-буфера и $4 \times 4 + 0,5 = 16,5$ мкл Taq-полимеразы.

4. Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера с Taq-полимеразой в течение 3–5 сек на микроцентрифуге/вортексе и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.2.5. Добавьте в каждую пробирку стрипов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл). Закройте крышки стрипов.

7.2.6. Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только тех стрипов, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата кДНК в соответствующие стрипованные пробирки для исследуемых образцов.

7.2.7. Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК и обратной транскрипции (п.7), в стрипованные пробирки, маркированные «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца в стрипованные пробирки, маркированные «К+».

7.2.8. Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.

7.2.9. Установите все стрипы в амплификатор детектирующий. Рекомендуется располагать пробирки по центру термоблока.

7.2.10. Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «воспаление.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тест «воспаление», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой) и проведите ПЦР.

7.3. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции (**фасовка для автоматических раскапывающих станций**).

7.3.1. Приготовьте **смесь ПЦР-буфера Стрим с Taq-АТ-полимеразой**.

В пробирку с ПЦР-буфером Стрим добавьте весь объём пробирки с Taq-полимеразой.

7.3.2. Встряхните пробирку со смесью в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.3.3. Внесите в 8 пробирок нового пустого стрипа по 140 мкл полученной смеси.

7.3.4. Центрифугируйте стрип на микроцентрифуге.

7.3.5. Поместить стрип на рабочий стол APC в соответствии со схемой на вкладыше.

7.3.6. Центрифугировать стрипы со смесями для амплификации Стрим.

Поместить стрипы со смесями для амплификации Стрим на рабочий стол APC в соответствии со схемой на вкладыше.

Открыть стрипы со смесью для амплификации.

9. Промаркируйте пустые **стрипы для выделенного из образцов препарата кДНК** (по одной пробирке стрипа для каждого образца кДНК, отрицательного контрольного образца, положительного контрольного образца).

7.3.10. Внесите в пустые стрипы по 120 мкл препарата кДНК, отрицательного контрольного образца, положительного контрольного образца.

ВНИМАНИЕ! Препарат кДНК следует развести: 30 мкл образца ДНК + 90 мкл Буфера для разведения ДНК. Таким же образом необходимо развести **положительный контрольный образец**.

7.3.11. Центрифугируйте стрипы с препаратами кДНК на центрифуге.

7.3.12. Поставьте два новых пустых стрипа на рабочий стол APC.

7.3.13. Запустите программу раскапывания APC.

7.3.14. Запечатайте плашку 384 на ламинаторе ДТпак в соответствии с инструкцией к прибору.

7.3.15. Поместите плашку 384 в детектирующий амплификатор.

7.3.16. Запустите программное обеспечение в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini-файл. При последующих постановках добавьте в протокол тест «экспрессия_воспаление», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.

Детекция и учёт результатов осуществляется амплификатором детектирующим автоматически.

После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6 части 1 («Работа с прибором») Руководства по эксплуатации для амплификаторов детектирующих). Анализ проводится программным обеспечением.

На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице будет показан идентификатор образца, название исследования, индикаторный цикл (Cp) по каждому исследованию, указана концентрация мРНК референсного гена (lg ГЭ/мл), рассчитаны отношения уровня экспрессии генов.

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт, содержащий оценку вероятности локальной воспалительной реакции для каждого исследуемого образца.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Чёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

После прохождения амплификации программное обеспечение сравнивает заданное оператором расположение пробирок с реальным положением маркера (флуоресцентной метки Rox), и, если находит несовпадение, то предупреждает оператора об этом. Оператору следует либо расположить данные из каждой отдельной пробирки в соответствующем порядке вручную, либо повторить исследование данного образца, правильно расположив пробирки в термоблоке.

- 9.3. В результатах анализа необходимо учитывать уровень экспрессии гена B2M. Значение концентрации мРНК гена B2M должно быть в диапазоне более 4,0 lg ГЭ/мл. Если значение менее 4 lg ГЭ/мл, то результаты следует интерпретировать как недостаточное количество материала или присутствие ингибиторов в материале. В этом случае может потребоваться повторное взятие клинического материала.
- 9.4. При наличии в исследуемом образце мРНК исследуемых генов, в строке с названием этого гена указано значение индикаторного цикла.
- 9.5. В случае отрицательного результата на наличие экспрессии генов (кроме IL10 TLR4) и отрицательного результата амплификации кДНК референсного гена, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца. Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате мРНК, полученном из урогенитальных соскобов; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение мРНК, либо повторный отбор биологического материала (выполняется последовательно). Для генов IL10 и TLR4 допускается отрицательный результат.
- 9.6. Для положительных контрольных образцов программа фиксирует положительный результат. При получении значений, выходящих за рамки допустимых значений (см. таблицу) результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.
- 9.7. Для отрицательных контрольных образцов программа фиксирует отрицательный результат. При получении положительных значений результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.
- 9.8. Значения Ср для положительного и отрицательного контрольных образцов

№ пробирки	Экспрессия генов. Воспаление влагалища	
	К+	К-
1-8	28...32	отсутствует

10. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

программное обеспечение рассчитывает индексы отношения экспрессии генов, представленных в таблице, на основании которых может быть вычислена вероятность локальной воспалительной реакции:

Вычисляемые коэффициенты	Границы нормы показателей	Повышенные уровни
IL1B/CD68	[0.01-12.7]	12.7-1600
IL10/IL18	[0-0.004]	0.04-1.3
TNF/IL18	[0.001-0.05]	0.0491-39
TLR4/GATA3	[0-0.07]	0.07-105

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

- 11.1. Срок годности набора – 9 месяцев с даты изготовления.
- 11.2. Все компоненты набора реагентов, кроме Taq-АТ-полимеразы и Taq-полимеразы, следует хранить при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности набора.
- 11.3. Taq-АТ-полимеразу и Taq-полимеразу следует хранить при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности.
- 11.4. Транспортировку набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре 2–8 °С в течение всего срока годности набора.
- 11.5. Набор с истекшим сроком годности использованию не подлежит.
- 11.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 11.7. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортировки, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора **Экспрессия генов. Воспаление влагалища**, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6,
тел./факс +7 (495) 980-45-55, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный),
E-mail: hotline@dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/support/>



Пронумеровано и прошнуровано
Специалист по регистрации
Ребрикова О.В.