



В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов ВПЧ-ГЕН-16/18 в фасовке S.
Перед началом работы изучите инструкцию.

Набор реагентов для выявления ДНК вирусов папилломы человека высокого онкогенного риска методом полимеразной цепной реакции

ВПЧ-ГЕН-16/18

Информация о наборе реагентов

Назначение:

Набор реагентов предназначен для выявления ДНК вирусов папилломы человека высокого онкогенного риска 16-го и 18-го типов методом ПЦР в биологическом материале человека: соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта, моча, секрет простаты, эякулят, биоптат.

Т а б л и ц а 1

Вариант исполнения	REF Фасовка S, пробирки	REF Фасовка S, стрипы ¹
HPV 16,18	R1-P301-23/9	R1-P301-S3/9
HPV 16	R1-P318-23/9	R1-P318-S3/9
HPV 18	R1-P319-23/9	R1-P319-S3/9

Выделение ДНК²:

Рекомендуются наборы/комплекты реагентов для выделения НК ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-МЧ-РАПИД (ООО «ДНК-Технология ТС»).

П р и м е ч а н и е – Не рекомендуется использовать комплект реагентов ПРОБА-РАПИД при выделении ДНК из соскобов из урогенитального тракта мужчин.

Специализированное оборудование:

Детектирующие амплификаторы планшетного и роторного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированные в установленном порядке в РФ, например, «ДТпрайм»³ и «ДТлайт»⁴ (ООО «НПО ДНК-Технология»), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH), CFX96 (Био-Рад Лабораториз, Инк), Applied Biosystems QuantStudio 5 («Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.»).

Количество анализируемых образцов:

96 определений (не более 24 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Т а б л и ц а 2 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow/Vic	Rox/Orange	Cy5/Red	Cy5.5/Crimson
Вариант исполнения HPV 16,18, смесь для амплификации HPV 16				
HPV 16	БК	-	-	-
Вариант исполнения HPV 16,18, смесь для амплификации HPV 18				
HPV 18	БК	-	-	-
Вариант исполнения HPV 16				
HPV 16	БК	-	-	-
Вариант исполнения HPV 18				
HPV 18	БК	-	-	-

¹ - не используется для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

² - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК определяется видом биологического материала

³ – модификация *М*

⁴ – модификация *S*

Состав набора реагентов:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок			Номинальный объём компонента
		Вариант исполнения			
		HPV 16,18	HPV 16	HPV 18	
Смесь для амплификации, запечатанная парафином. Вирус папилломы человека 16 типа (HPV 16)	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	-	по 20 мкл
Смесь для амплификации, запечатанная парафином. Вирус папилломы человека 18 типа (HPV 18)	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	-	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	4 пробирки	2 пробирки	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	4 пробирки	2 пробирки	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец HPV 16 ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1 пробирка	-	130 мкл
Положительный контрольный образец HPV 18 ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	-	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов ²	24 шт.	12 шт.			

Проведение анализа

1 Выделение ДНК

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов для выделения НК ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-МЧ-РАПИД.

Примечание – Не рекомендуется использовать комплект реагентов ПРОБА-РАПИД при выделении ДНК из соскобов из уrogenитального тракта мужчин.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. Для этого рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот в объеме, указанном в инструкции по применению соответствующего набора/комплекта реагентов.

2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесями для амплификации!

2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы» следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесями для амплификации HPV 16 и/или HPV 18, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 24 постановки при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца (для каждой смеси для амплификации) в каждой постановке.

Пример:

Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 4 пробирки со смесями для амплификации HPV 16 и/или HPV 18 для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок для каждой смеси – 6.

2.2 Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы на микроцентрифуге-вortexe в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вortexe в течение 1-3 с.

2.3 Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.

ВНИМАНИЕ! При использовании для проведения ПЦР детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q минеральное масло в пробирки не вносится!

2.4 Добавьте в каждую пробирку (при необходимости) по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Неплотно прикройте пробирки/стрипы крышками.

¹ - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «К+»

² - входит в состав набора реагентов при расфасовке смесей для амплификации, запечатанных парафином, в стрипы

2.5 Встряхните пробирки с положительными контрольными образцами на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортке в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца перед внесением в пробирки с реакционной смесью необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведенные в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-РАПИД и ПРОБА-ГС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки), необходимо встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортке в течение 1-3 с.

3. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 1-3 с, затем поместить пробирки в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортке в течение 1-3 с.

4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их, перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Необходимо закрывать пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

2.6 Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-» и «К+», ДНК не вносится.

2.7 Внесите в пробирки, промаркированные «К-», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

2.8 Внесите в пробирки, промаркированные «К+», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл соответствующего положительного контрольного образца.

2.9 Центрифугируйте все пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортке в течение 3-5 с (при использовании для проведения ПЦР детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).

2.10 Установите все пробирки/стрипы в детектирующий амплификатор.

2.11 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательных и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 2.10) и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведенная в таблице 3.

2.12 Для детектирующих амплификаторов Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:

Проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведенным в таблицах 4, 5, 6 соответственно.

Т а б л и ц а 3 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	25 ²	...	...	Хранение		Хранение
√ - режим оптических измерений						

Т а б л и ц а 4 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

№ / Cycling	Температура, °C / Temperature	Время, с / Hold Time, s	Количество циклов / Cycle Repeats
Cycling	80 deg	60	1 time
	94 deg	90	
Cycling 2	94 deg	30	5 times
	57 deg ✓	15	
Cycling 3	94 deg	10	45 times
	57 deg ✓	15	
✓ - режим оптических измерений, установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам детекции Green (Fam) и Yellow (Hex) при 57 °C			

¹ - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А инструкции по применению) или предоставляется производителем набора реагентов
² - допускается хранение при температуре 10 °C

Таблица 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96

№ блока (Step)	Температура, °C	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
1	80	01:00	1
2	94	01:30	1
3	94	00:15	50
4	64 ✓	00:20	
✓ - режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex) при 64 °C			

Таблица 6 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов Applied Biosystems QuantStudio 5

Стадия	№ шага	Температура, °C	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
Стадия удержания	1	80	01:00	1
	2	94	01:30	1
Стадия ПЦР	1	94	00:20	50
	2	64 ✓	00:20	
✓ - сбор данных для необходимых флуорофоров (Fam, Vic (Hex)) включен				

3 **Регистрация и учёт результатов ПЦР** осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором.
При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Subtraction» необходимо выбрать «Baseline Subtraction Curve Fit».
Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 7. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 7 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции				Интерпретация результата
Fam/Green, Cp/Cq/Ct		Hex/Yellow/Vic, Cp/Cq/Ct		
Смесь для амплификации				
HPV 16	HPV 18	HPV 16	HPV 18	
Неизвестные образцы				
Указан	Не указан	Не учитывается	Указан	Обнаружена ДНК HPV 16
Не указан	Указан	Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК HPV 18
Указан	Указан	Не учитывается		Обнаружена ДНК HPV 16 и HPV 18
Не указан	Не указан	Указан		Не обнаружена ДНК HPV 16 и HPV 18
Не указан		Не указан		Недостоверный результат
Отрицательный контрольный образец				
Не указан		Указан		Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец				
Указан		Не учитывается		Положительный результат Результаты постановки валидны

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.
Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °C до 25 °C не более 5 суток.
Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности набора реагентов. Смеси для амплификации, запечатанные парафином, следует хранить в защищённом от света месте.
Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.
По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.