

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК
вируса простого герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловируса
(HSV1/HSV2/CMV)
в режиме реального времени

HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс

Регистрационное удостоверение МЗ СР РФ
ФСР 2011/10429

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК вируса простого герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловируса (HSV1/HSV2/CMV)

в режиме реального времени

HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1.** Комплект реагентов HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс предназначен для одновременного выявления ДНК HSV1, HSV2 и CMV в биологическом материале человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в формате «мультиплекс». Такой способ детекции позволяет в одной пробирке определить наличие ДНК вируса простого герпеса 1 и 2 типов и цитомегаловируса, и провести их дифференциацию.
- 1.2.** Комплект может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1. Принцип действия

Принцип метода ПЦР основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Комплект реагентов HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс включает смесь для амплификации, специфичную для вируса простого герпеса 1 и 2 типов и цитомегаловируса (HSV1, HSV2, CMV). В пробирки со смесью для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

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 реакционную смесь

происходит только после плавления парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

В смесь для амплификации 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 состав ДНК-зондов, использующихся для детекции продуктов амплификации фрагментов геномов HSV1, CMV, HSV2, включены флуоресцентные метки Cy5, Rox и Fam соответственно. В состав ДНК-зонда, используемого для детекции продукта амплификации внутреннего контрольного образца, входит флуоресцентный краситель Hex (таблица 1).

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Для проведения ПЦР используют амплификаторы детектирующие ДТлайт¹ и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»).

ВНИМАНИЕ! Возможность использования других амплификаторов необходимо уточнить у представителя компании.

Таблица 1.

Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5
Herpes simplex virus 2 (HSV2)	ВК	Cytomegalovirus (CMV)	Herpes simplex virus 1 (HSV1)

2.2. Состав комплекта

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК вируса простого герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловируса (HSV1/HSV2/CMV)

¹ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2

в режиме реального времени (HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс) включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Taq-полимеразы MAX – 2 пробирки (по 480 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 960 мкл);
- положительный контрольный образец («К+») – 1 пробирка (150 мкл).

2.3. Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки) – от 1,5 ч.

2.4. Комплект рассчитан на проведение 96 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

Для образцов биологического материала человека, содержащих ДНК HSV1, HSV2 или CMV, амплификатор должен регистрировать положительный результат по соответствующему каналу детекции.

Для образцов биологического материала, не содержащих ДНК HSV1, HSV2 или CMV, амплификатор должен регистрировать отрицательный результат по соответствующим каналам детекции.

ВНИМАНИЕ! При высокой первоначальной концентрации ДНК одного из определяемых возбудителей возможно получение ложноотрицательного результата для возбудителя, ДНК которого присутствует в низкой концентрации (п. «Учёт результатов реакции»).

3.2. Аналитическая чувствительность на 1,0 мл образца:

2000 геном-эквивалентов ДНК HSV1,
2000 геном-эквивалентов ДНК HSV2,
2000 геном-эквивалентов ДНК CMV.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с комплектом реагентов HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- штатив «рабочее место» для пробирок объемом 0,2 мл или стрипованных пробирок объемом 0,2 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 2–20 мкл, 20–200 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой «RNase-free, DNase-free» объемом 20 мкл, 200 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-НК или ПРОБА-ГС производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

Программное обеспечение для амплификаторов детектирующих ДТлайт и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.3.4.0.²;
- файл ГерпесКомплекс.ini

² – последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»:

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

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Для исследования используют мочу; соскобы эпителиальных клеток из уретры, цервикального канала, с заднего свода влагалища; содержимое пустиул, везикул, язв; плазму крови.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для выделения ДНК из биологического материала.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-НК и ПРОБА-ГС.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки.

7.2. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1. Промаркируйте по одной пробирке со смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца («К-») и положительного контрольного образца («К+»).

7.2.2. Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы МАХ в течение 3–5 сек на микроцентрифуге/вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 сек.

7.2.3. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы МАХ.

7.2.4. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

Примечание. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением

следующего. Образцы следует вносить наконечниками с аэрозольным барьером.

- 7.2.5. Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.
- 7.2.6. Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, в пробирку, маркированную «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».
- 7.2.7. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.
- 7.2.8. Установите все пробирки в амплификатор детектирующий.
- 7.2.9. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первой постановке загрузите файл «ГерпесКомплекс.ini» (п. 7.3.) При последующих постановках добавьте в протокол тест «ГерпесКомплекс» (п. 7.4.), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (п. 7.4.6.) и проведите ПЦР.
- 7.2.10. При выборе теста «ГерпесКомплекс» в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

Таблица 2.

Программа амплификации для амплификаторов детектирующих
ДТлайт и ДТ-96

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	30	1		Цикл
	94,0	1	30			
2	94,0	0	30	5		Цикл
	64,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		Цикл
	64,0	0	15		√	
4	94,0	0	5	1		Цикл
5	10,0	Хранение		Хранение

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов необходимо уточнить программу амплификации у представителя компании.

7.3. Загрузка теста «ГерпесКомплекс» для амплификаторов детектирующих при первой постановке на данном компьютере.

Версия ПО не ниже 7.3.4.0.³

Примечание. Для иллюстраций использованы скриншоты версий 7.3.4.0, 7.3.4.2.

Тест «ГерпесКомплекс» для приборов ДТлайт и ДТ-96 предоставляется производителем комплекта (файл ГерпесКомплекс.ini). Его установку в программу RealTime_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке.

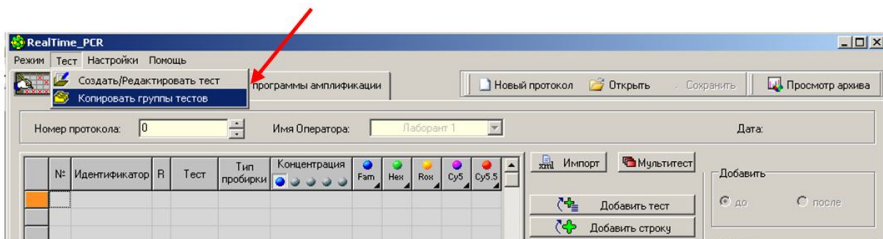
7.3.1. Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс, выберите режим «Работа с прибором».

³ – последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»:

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

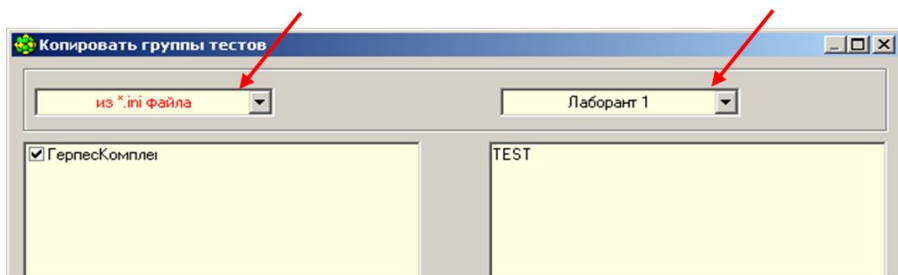
Примечание. При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию, в которую по умолчанию будет сохраняться файл с результатами.


7.3.2. В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».

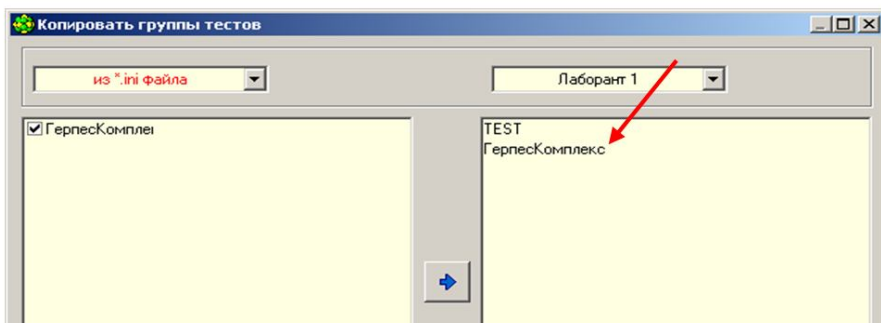


7.3.3. В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «ГерпесКомплекс».

7.3.4. В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которому необходимо скопировать тест «ГерпесКомплекс».



7.3.5. Нажмите кнопку , после чего выбранный тест появится в правой половине окна.

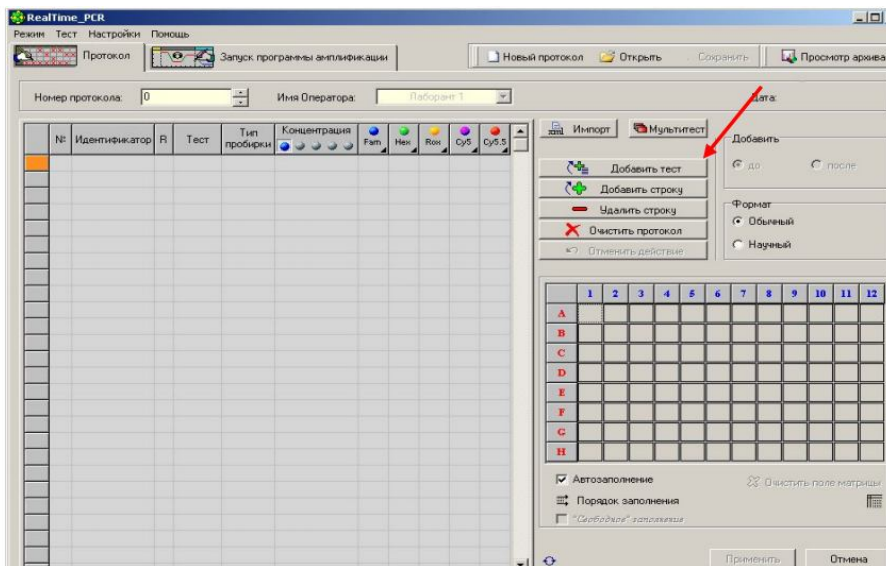


7.3.6. Теперь с тестом «ГерпесКомплекс» может работать оператор, для которого был скопирован тест.

7.4. Ежедневная работа с тестом «ГерпесКомплекс»

7.4.1. Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (см. п.7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

7.4.2. Нажмите кнопку «Добавить тест».



7.4.3. Выберите из списка тест «ГерпесКомплекс».

Добавить тест

Тест: q+ ГерпесКомплекс

Описание: q+ ГерпесКомплекс

Тип анализа: Качественный

1. Образцы: Количество: 1 Дубли: 1

2. Стандарты: Значения стандартов из другого протокола
Количество: 0 Дубли: 2

3. Контроли: Положительные (K+): 0
Отрицательные (K-): 0

Подробнее Ок Отмена

7.4.4. Укажите количество исследуемых образцов, положительных и отрицательных контролей, нажмите кнопку «Ок».

Добавить тест

Тест: q+ ГерпесКомплекс

Описание:

Тип анализа: Мультиплекс_q+


1. Образцы: Количество: 1 (x1) Дубли: 1

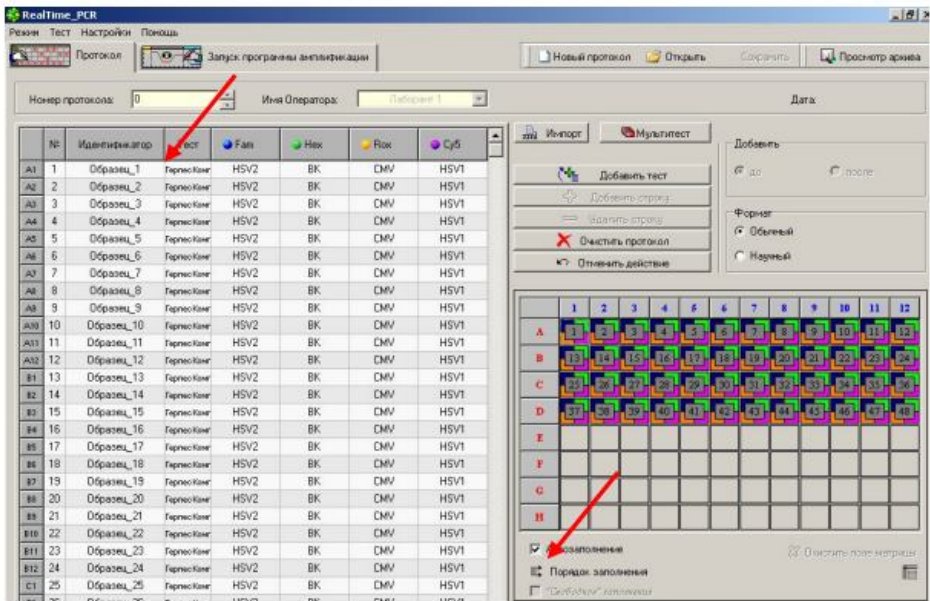
2. Стандарты: Значения стандартов из другого протокола
Количество: 0 Дубли: 1

3. Контроли: Положительные (K+): 0 (x1)
Отрицательные (K-): 0 (x1)

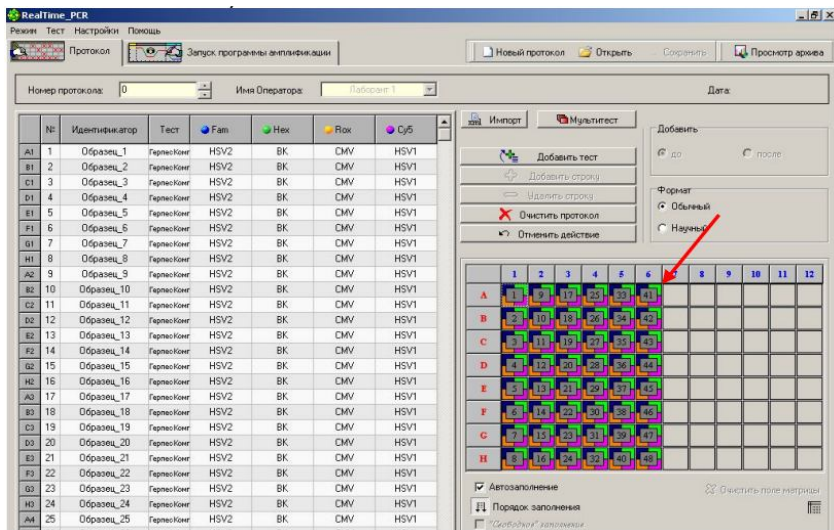
Подробнее Ок Отмена

7.4.5. Укажите идентификаторы пробирок. Нажмите кнопку

«Порядок заполнения» –  .

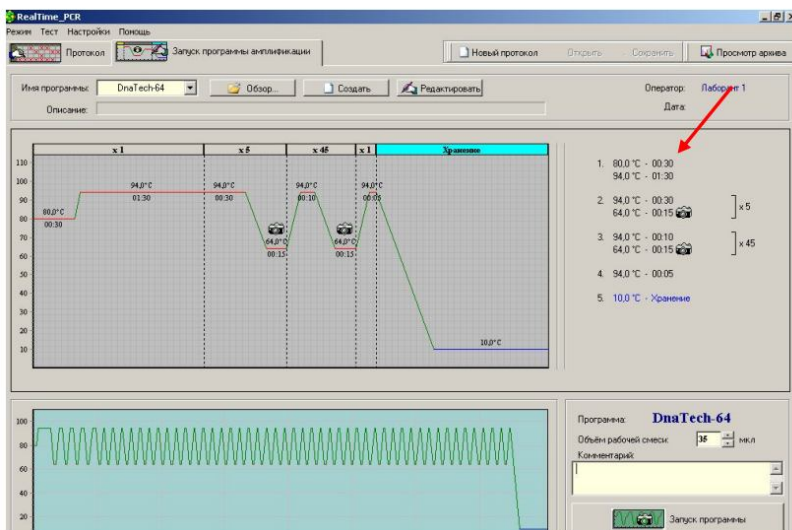


7.4.6. Отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.



7.4.7. Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».

7.4.8. В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации «DnaTech-64».



7.4.9. Нажмите кнопку «Запуск программы» в правом нижнем углу окна.

7.4.10. Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора, см.п.7.3.1.).

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации.


Детекция и учёт результатов осуществляется амплификатором детектирующим в соответствии с инструкцией к прибору.




После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п. 4.6. «Руководство по эксплуатации. Часть 1. Работа с прибором»).

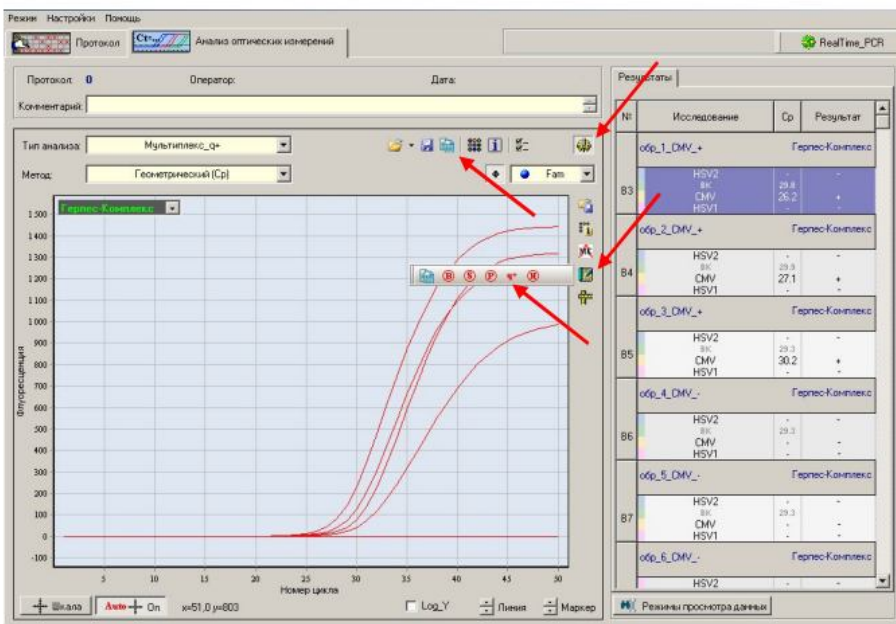
Анализ проводится автоматически. На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан

идентификатор образца, название исследования, индикаторный цикл (Cp), результат по каждому исследованию (качественный анализ).

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчёт по результатам анализа.

Для создания лабораторного отчета необходимо нажать кнопку  «Отчёт по результатам анализа».

Для создания специализированного отчета следует открыть инструментальную панель (кнопка ) , выбрать «Отчёты» (кнопка ) , выбрать «Специализированный отчёт по Мультиплексам_q+» (кнопка ) .



9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Для биологических образцов, содержащих ДНК одного или нескольких патогенов (HSV1, HSV2, CMV), детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции на соответствующих каналах, программа фиксирует положительный результат.

ВНИМАНИЕ! Если для биологического образца регистрируется рост флуоресценции специфического продукта на каналах Fam, Rox или Cy5 раньше 24 цикла по Сr (Сr менее 24), то это говорит о высокой первоначальной концентрации ДНК соответствующего возбудителя. В данном случае возможно получение ложноотрицательного результата для возбудителя, ДНК которого присутствует в низкой концентрации. В этом случае рекомендуется повторно провести ПЦР выделенного препарата с использованием комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК HSV 1, 2 и комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК CMV производства ООО «НПО ДНК-Технология».

9.2. Для биологических образцов, не содержащих ДНК определяемых возбудителей, и отрицательного контрольного образца детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции по каналу Hcx (внутренний контрольный образец), рост флуоресценции по каналам Fam, Rox и Cy5 отсутствует, программа фиксирует отрицательный результат.

9.3. Внутренний контрольный образец (канал Hcx) определяется в биологических образцах, положительном контрольном образце и отрицательном контрольном образце. При высокой первоначальной концентрации какой-либо специфичной ДНК-мишени в биологических образцах рост уровня флуоресценции на канале Hcx может не регистрироваться.

9.4. В случае отсутствия экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфичного продукта (по каналам Fam, Rox или Cy5) и для внутреннего контрольного образца (по каналу Hcx), программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца. Недостоверный результат может быть связан с присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным

выполнением протокола анализа; несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется повторная постановка препарата ДНК, повторное выделение ДНК, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

- 9.5.** Для положительного контрольного образца программа фиксирует положительный результат. При получении отрицательного значения результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.
- 9.6.** Для отрицательного контрольного образца программа фиксирует отрицательный результат по каналам Fam, Rox и Cy5. При получении положительного значения результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.
- 10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ КОМПЛЕКТА**
- 10.1.** Срок годности комплекта – 6 месяцев с даты изготовления.
- 10.2.** Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК следует хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности.
- 10.3.** Транспортировку комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав комплекта.
- 10.4.** Комплект с истекшим сроком годности применению не подлежит.
- 10.5.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.
- 10.6.** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплекта требованиям технических условий при соблюдении условий транспортировки, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК вируса простого герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловируса (HSV1/HSV2/CMV) в режиме реального времени

(HSV1/HSV2/CMV ГерпесКомплекс), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 11, ООО «ДНК-Технология»
Тел./факс + 7 (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru

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

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 11
Тел./факс (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru