

Миелоскрин MPL

набор реагентов для качественного определения мутаций W515L и W515K в гене MPL методом ПЦР в реальном времени

мутация	ген
W515L	MPL
W515K	MPL

Инструкция по применению

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Хронические миелоидные опухоли (ХМО) представляют собой группу Ph-негативных хронических лейкозов, к которым относятся: истинная полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), первичный миелофиброз (ПМФ). Соматические мутации в гене рецептора тромбопоэтина (myeloproliferative leukemia virus – MPL) не выявляется у пациентов при ИП, но характерна для 30-40% случаев V617F JAK2 негативных ЭТ и ПМФ. Поскольку лишь менее 15% всех вариантов клинически и морфологически верифицированных ХМН не ассоциированы с драйверными мутациями заболевания, их идентификация признана специфическим диагностическим тестом и одним из основных критериев постановки диагноза (ВОЗ 2016).

Набор реагентов предназначен для качественного выявления мутаций W515L и W515K в гене MPL методом ПЦР в режиме реального времени. Анализируемым материалом является ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови или из сухих пятен крови. Также данный набор позволяет определять мутации в гене MPL в образцах сухих пятен крови. Результатом анализа является установление наличия или отсутствия соматических мутаций W515L, W515K в гене MPL в образце ДНК человека. Набор предназначен для профессионального использования и служит вспомогательным средством для диагностики пациентов с подозрением на хроническую миелоидную опухоль.

Набор реагентов может быть использован в клиничко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип метода

Выявление исследуемых мутаций основано на методе ПЦР в режиме реального времени с использованием зондов TaqMan. В результате проведения реакции зонд с флюоресцентной меткой (FAM) разрушается при наличии искомой мутации с высвобождением красителя, который регистрируется системой детекции амплификатора. Наличие флюоресцентного сигнала свидетельствует о наличии исследуемой мутации. Набор комплектуется положительным (ПКО) и отрицательным (ОКО) контрольными образцами для контроля прохождения реакции амплификации.

2.2. Состав набора и форма выпуска

Набор рассчитан на проведение 50 тестов, включая позитивный и негативный контроли.

Набор реагентов состоит из комплекта реагентов для проведения ПЦР-РВ.

Набор поставляется в картонной коробке. Все реагенты разлиты в пластиковые герметичные пробирки с цветовой кодировкой этикеток.

Все компоненты набора готовы к использованию, в составе набора отсутствуют лиофилизированные компоненты.

Набор включает в себя:

Название	Описание	Объем, мкл	Кол-во (шт)
W	Прозрачная бесцветная жидкость	900	1
MPL-L	Прозрачная бесцветная жидкость	900	1
MPL-K	Прозрачная бесцветная жидкость	900	1
Тақ-полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	95	1
Положительный контрольный образец (ПКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	250	1
Отрицательный контрольный образец (ОКО)	Прозрачная бесцветная жидкость	250	1
Инструкция по применению	-	-	1

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Контрольные образцы. В состав набора входит **положительный контрольный образец (ПКО)** содержащий линеализированную плазмиду с клонированными мутантными аллелями гена MPL и **отрицательный контрольный образец (ОКО)**.

Чувствительность. Аналитическая чувствительность метода составляет 0,6% относительной концентрации мутации W515L и W515K в гене MPL в клиническом образце (положительный результат).

Специфичность. Анализ надежно выявляет только мутации W515K и W515L в гене MPL.

Воспроизводимость. Воспроизводимость результатов в пределах одной производственной серии составляет 100%, между сериями - 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.
2. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н).
3. Работают только в одноразовых перчатках, используют и меняют при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером.
4. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
5. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.
6. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после начала работ облучаться ультрафиолетовым светом.
7. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.
8. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.
9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.
10. Ключевой мерой предосторожности при работе с набором является соблюдение требований, изложенных в ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», утвержденном Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007 г.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Амплификатор детектирующий.
2. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, до 100 мкл и до 1000 мкл.
3. Ламинарный шкаф.
4. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой до минус 16°С.

5. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл.
6. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
7. Стерильные микропробирки для ПЦР объемом 0,2 мл.
8. Автоматические пипетки переменного объема.

6. МАТЕРИАЛ ДЛЯ АНАЛИЗА

В качестве образца допускается использовать ДНК, выделенную из лейкоцитов цельной крови человека или из сухих пятен крови. Чистота образцов ДНК (соотношение A260/A280) должна быть $>1,8$. Рекомендуемая концентрация ДНК, вносимая в реакционную смесь 5-80 нг.

7. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Транспортирование набора необходимо производить с хладоэлементами не допуская длительного (более 12 час размораживания). Необходимо избегать многократного (более 20 циклов) замораживания-размораживания. Транспортировка набора реагентов может производиться в термоконтейнерах с соблюдением необходимых температурных режимов всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

Транспортировка и хранение должны осуществляться в упаковке предприятия-изготовителя в сухом, защищенном от света месте в течение всего срока годности с соблюдением необходимых температурных режимов.

Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

8. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора составляет 12 месяцев с даты производства при соблюдении условий транспортировки и хранения. Нельзя использовать набор после установленной даты окончания срока годности. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

9. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ

Набор предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом.

10. ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

10.1 Подготовка реагентов

Все компоненты набора готовы к использованию.

10.2 Процедура тестирования

1. Довести все компоненты набора до комнатной температуры, тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 сек на микроцентрифуге для сброса капель с крышек пробирок. Таq-полимераза не требует размораживания, использовать непосредственно из морозильной камеры (-20°C), после использования сразу убрать в морозильную камеру.
2. Подготовить необходимые объемы реакционной смеси отдельно для MPL-L, MPL-K и W. Для N проб расчет необходимого количества смесей представлен в таблице 3. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 сек при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для сброса капель с крышек пробирок.

Таблица 3. Расчет необходимого количества ПЦР-смесей для анализа N-проб

Название смеси	Кол-во смеси, мкл	Кол-во Таq-полимеразы*, мкл	Кол-во микропробирок для ПЦР
W	$(N+2)*15$	$(N+2)*0,5$	$(N+2)*3$
MPL-L	$(N+2)*15$	$(N+2)*0,5$	
MPL-K	$(N+2)*15$	$(N+2)*0,5$	

*Таq-полимеразу вносить в реакционные смеси в последнюю очередь.

3. Отобрать необходимое количество микропробирок для ПЦР на 0,2 мл (таблица 3).
4. Внести в каждую микропробирку для ПЦР, предназначенную для детекции W, MPL-L, MPL-K по 15 мкл соответствующей реакционной смеси.
5. Разморозить исследуемые образцы, ПКО и ОКО.
6. Внести в пробирки с реакционными смесями по 10 мкл исследуемых образцов ДНК, ПКО и ОКО, используя наконечники с аэрозольным барьером. Пробирки кратковременно перемешать на вортексе.
7. Поместить пробирки в амплификатор. Использовать следующую программу амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 4):

Таблица 4. Протокол ПЦР

Цикл	Повторов	Шаг	Время	Температура	Камера
1	1	1	5 мин	95°C	
2	45	1	15 с	95°C	
		2	60 с	60°C	Включена (FAM канал)

10.3 Анализ и учет результатов

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме «реального времени» в соответствии с инструкцией к прибору.

1. Определить пороговый цикл (Ct) для каждой пробирки.
2. Пороговые циклы смесей ОКО должны быть более 35, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
3. Пороговый цикл всех пробирок ПКО должен быть менее 35, иначе результаты всех исследуемых образцов считаются недостоверными.
4. Если у исследуемого образца пороговый цикл в пробирке MPL-L менее 35, то данный образец считается положительным по мутации W515L MPL.
5. Если у исследуемого образца пороговый цикл в пробирке MPL-K менее 35, то данный образец считается положительным по мутации W515K MPL.
6. Если у исследуемого образца пороговый цикл в пробирке MPL-K и MPL-L более 35, то данный образец считается отрицательным по мутациям W515L и W515K.

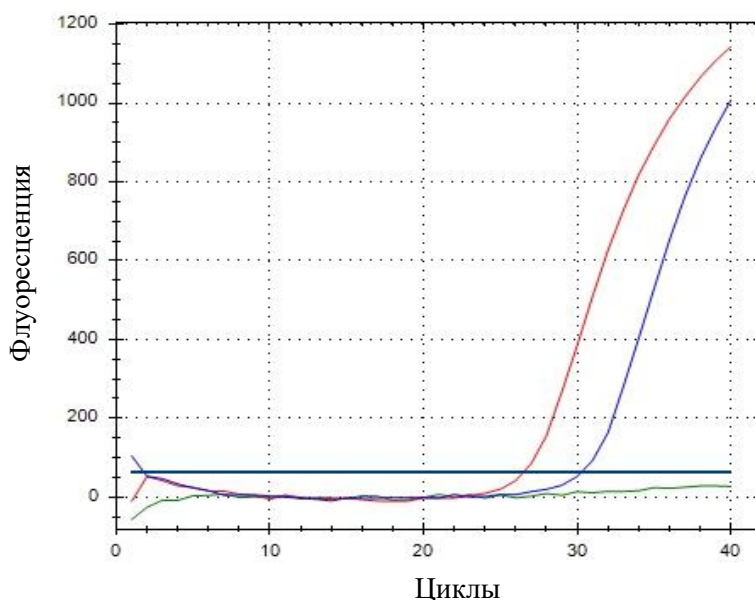


Рисунок 1. Пример кривых накопления флуоресцентного сигнала в пробе с мутацией W515L в гене MPL: красным цветом обозначен контрольный ген (смесь W), синим цветом мутантный аллель (смесь MPL-L), зеленым цветом мутантный аллель (смесь MPL-K).

11. ОГРАНИЧЕНИЯ

Этот тест дает качественные результаты и показывает присутствие мутаций в образце, что не должно рассматриваться как единственный критерий для диагностики ХМО. Так же, как и при любом другом диагностическом тестировании, все результаты должны быть интерпретированы вместе с клиническими данными, которыми располагает врач.

12. УТИЛИЗАЦИЯ (УНИЧТОЖЕНИЕ) И ДЕЗИНФЕКЦИЯ

При работе с исследуемыми образцами и отходами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»), утвержденных департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г.). Нормы контроля, дезинфекции и утилизации изложены в Постановлении Главного государственного санитарного врача РФ от 9 декабря 2010 г. №163 «Об утверждении СанПиН 2.1.7.2790-10 „Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами“».

Дезинфекцию, а также утилизацию или уничтожение наборов реагентов и отходов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Возможные типы отходов:

- все компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности набора реагентов, и упаковочная тара (класс А);
- использованные в ходе работы набора реагентов компоненты (класс Б);
- амплификат, образовавшийся после проведения ПЦР-РВ (класс Б).

Компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности, имеют класс опасности А на основании СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Сбор отходов класса А осуществляется в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного. Одноразовые пакеты располагаются на специальных тележках или внутри многоразовых контейнеров. Емкости для сбора отходов и тележки должны быть промаркированы "Отходы. Класс А". Заполненные многоразовые емкости или одноразовые пакеты доставляются с использованием средств малой механизации и перегружаются в маркированные контейнеры, предназначенные для сбора отходов данного класса, установленные на специальной площадке (помещении).

Компоненты, использованные в ходе работы набора реагентов, и выделенная ДНК в элюирующем растворе, не используемая для дальнейших исследований и архивного хранения, имеют класс опасности Б на основании СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

Отходы класса Б собираются в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или имеющие желтую маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов.

Для сбора органических, жидких отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокальваемые влагостойкие емкости с крышкой (контейнеры), обеспечивающей их герметизацию и исключающей возможность самопроизвольного вскрытия.

13.ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Не применимо.

14.ТЕКУЩИЙ РЕМОНТ

Не применимо.

15.ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

По вопросам качества набора следует обращаться в ООО «Формула гена» по фактическому адресу: 660036, Россия, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, строение 45, офис 102, тел. +7 (391) 290-55-13, e-mail: mail@formulagena.ru