УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НекстБио»

_____ О. О. Лавинюков

27.08.2021

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ДНК ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 6 И 11 ГЕНОТИПОВ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» «АМПЛИПРАЙМ® ВПЧ 6/11» ПО ТУ 21.20.23-036-09286667-2020

Форма выпуска 1

Форма выпуска 2

Форма выпуска 3

Краткое руководство по применению версии 27.08.21

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Руководитель отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»

_____ М. Н. Гарас

27.08.2021

Младший специалист по документации отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»

_____ Л. М. Самигуллина

27.08.2021

Директор научно-производственного комплекса ООО «НекстБио»

_____ М. Е. Сенина

27.08.2021

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Краткое руководство

по применению набора реагентов для качественного и количественного определения и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 генотипов методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» по ТУ 21.20.23-036-09286667-2020

«АмплиПрайм® ВПЧ 6/11»

Форма выпуска 1

REF P2046-41

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим свободный бесперебойный доступ в интернет).

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ мазки со слизистой оболочки влагалища (помещенные в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (помещенный в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (помещенный в транспортную среду для жидкостной цитологии);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры (помещенный в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки.

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь ВПЧ 6/11	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин	0,01	100 пробирок
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,20	1 пробирка
К1 ВПЧ 6/11	Прозрачная жидкость	0,12	1 пробирка
К2 ВПЧ 6/11		0,12	1 пробирка
ОКО		1,10	1 пробирка
К-		0,26	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 1
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С ... 8°С в защищенном от света месте

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ВНИМАНИЕ! Для материала, взятого в транспортную среду для жидкостной цитологии, требуется предварительная подготовка.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ, ВЗЯТЫХ В ТРАНСПОРТНУЮ СРЕДУ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ

Отобрать аликвоту клеток для исследования методом ПЦР одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовую пробирку. Рекомендуется отобрать аликвоту клеток сначала для ПЦР-исследования, после – для проведения жидкостной цитологии.

ПОДГОТОВКА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ВЫБРАТЬ ОДИН ИЗ ВАРИАНТОВ)

Вариант 1

1. Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток и оставить на 12 часов для осаждения клеток.
2. Аккуратно из раствора отобрать **0,5 – 1,0 мл осевших клеток** со дна флакона и перенести в чистую пробирку объемом 1,5 мл, на пробирке указать название образца.
3. Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.
4. Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок. В пробирке должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

Вариант 2

1. Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток.
2. Аккуратно из раствора отобрать **2 – 5 мл клеточной суспензии** (в зависимости от ее плотности) и перенести в чистую пробирку объемом 5 мл, на пробирке указать название образца.
3. Пробирки с образцами центрифугировать при **600 g** (3000 об/мин) **не менее 10 минут** или оставить пробирки в штативе при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) на 12 часов для осаждения клеток.
4. Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок.
5. В пробирке на 5 мл должно остаться 900 - 1000 мкл осадка. Перенести в чистую пробирку на 1,5 мл весь объем осадка.
6. Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.
7. Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки аналогично п. 4. В пробирке на 1,5 мл должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

ОТМЫВКА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

1. В каждую пробирку с осадком клеток внести по **1 мл М-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ». Тщательно перемешать пробирки на вортексе и поставить осаждаться на **30 мин** в штативе.

ВНИМАНИЕ! Если по истечении 30 минут в пробирке видны следы не растворившейся слизистой пробки, необходимо дополнительно перемешать пробирку на вортексе и оставить в штативе еще на 15 мин.

2. Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин**.
3. Аккуратно удалить надосадочную жидкость по стенке пробирки, не захватывая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Оставить 100 - 200 мкл осадка.
4. В каждую пробирку внести по **1 мл Ф-буфера** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно перемешать на вортексе.
5. Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин**.
6. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 4. Оставить 100 - 200 мкл осадка. Далее, аккуратно удалить остаток надосадочной жидкости, не захватывая осадок, из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром на 200 мкл, используя автоматический дозатор.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7. В каждую пробирку с осадком клеток внести по **100 мкл Ц-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно ресуспендировать осадок пипетированием, используя отдельный наконечник с фильтром на 200 мкл для каждой пробы. Пробирки перемешать на вортексе.
8. Инкубировать пробы **не менее 2 часов (допускается оставить на ночь)** при температуре **60 ºС**.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью ВПЧ 6/11 для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции.
2. Внести в подготовленные пробирки ПЦР-буфер-К и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфер-К	в пробирки с ПЦР-смесью ВПЧ 6/11 на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** ПЦР-буфер-К не должен проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Проба, экстрагированная из ОКО	в пробирку для образца ОК (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)
К2 ВПЧ 6/11 *(при проведении качественного и количественного анализа)*	в пробирку для образца К2
К1 ВПЧ 6/11 *(при проведении только количественного анализа)*	в пробирку для образца К1

3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[1], Cy5	

[1] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Лист регистрации изменений

Изм.	Номера листов				Всего листов в документе	Номер извещения об изменении	Изменения внес	Дата
	изменённых	заменённых	новых	аннулированных				
1	-	1 - 4	5	-	5	09286667.038.4/6-2021	Л.М. Самигуллина	27.08.21

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Краткое руководство

по применению набора реагентов для качественного и количественного определения и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 генотипов методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» по ТУ 21.20.23-036-09286667-2020

«АмплиПрайм® ВПЧ 6/11»

Форма выпуска 2

REF 2046-42

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим свободный бесперебойный доступ в интернет).

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ мазки со слизистой оболочки влагалища (помещенные в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (помещенный в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (помещенный в транспортную среду для жидкостной цитологии);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры (помещенный в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки.

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь ВПЧ 6/11	Прозрачная жидкость	1,20	1 пробирка
ПЦР-буфер-Н		0,65	1 пробирка
К1 ВПЧ 6/11		0,12	1 пробирка
К2 ВПЧ 6/11		0,12	1 пробирка
ОКО		1,10	1 пробирка
К-		0,26	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 2
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С ... 8°С в защищенном от света месте

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ВНИМАНИЕ! Для материала, взятого в транспортную среду для жидкостной цитологии, требуется предварительная подготовка.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ, ВЗЯТЫХ В ТРАНСПОРТНУЮ СРЕДУ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ

Отобрать аликвоту клеток для исследования методом ПЦР одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовую пробирку. Рекомендуется отобрать аликвоту клеток сначала для ПЦР-исследования, после – для проведения жидкостной цитологии.

ПОДГОТОВКА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ВЫБРАТЬ ОДИН ИЗ ВАРИАНТОВ)

Вариант 1

1. Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток и оставить на 12 часов для осаждения клеток.
2. Аккуратно из раствора отобрать **0,5 – 1,0 мл осевших клеток** со дна флакона и перенести в чистую пробирку объемом 1,5 мл, на пробирке указать название образца.
3. Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.
4. Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок. В пробирке должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

Вариант 2

1. Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток.
2. Аккуратно из раствора отобрать **2 – 5 мл клеточной суспензии** (в зависимости от ее плотности) и перенести в чистую пробирку объемом 5 мл, на пробирке указать название образца.
3. Пробирки с образцами центрифугировать при **600 g** (3000 об/мин) **не менее 10 минут** или оставить пробирки в штативе при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) на 12 часов для осаждения клеток.
4. Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок.
5. В пробирке на 5 мл должно остаться 900 - 1000 мкл осадка. Перенести в чистую пробирку на 1,5 мл весь объем осадка.
6. Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.
7. Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки аналогично п. 4. В пробирке на 1,5 мл должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

ОТМЫВКА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

1. В каждую пробирку с осадком клеток внести по **1 мл М-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ». Тщательно перемешать пробирки на вортексе и поставить осаждаться на **30 мин** в штативе.

ВНИМАНИЕ! Если по истечении 30 минут в пробирке видны следы не растворившейся слизистой пробки, необходимо дополнительно перемешать пробирку на вортексе и оставить в штативе еще на 15 мин.

2. Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин**.
3. Аккуратно удалить надосадочную жидкость по стенке пробирки, не захватывая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Оставить 100 - 200 мкл осадка.
4. В каждую пробирку внести по **1 мл Ф-буфера** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно перемешать на вортексе.
5. Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин**.
6. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 4. Оставить 100 - 200 мкл осадка. Далее, аккуратно удалить остаток надосадочной жидкости, не захватывая осадок, из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром на 200 мкл, используя автоматический дозатор.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7. В каждую пробирку с осадком клеток внести по **100 мкл Ц-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно ресуспендировать осадок пипетированием, используя отдельный наконечник с фильтром на 200 мкл для каждой пробы. Пробирки перемешать на вортексе.
8. Инкубировать пробы **не менее 2 часов (допускается оставить на ночь)** при температуре **60 ºС**.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объем реагентов, необходимый для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь ВПЧ 6/11	**10,0***(N+1)	**N** – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	**5,0***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью ВПЧ 6/11 и ПЦР-буфером-Н, осадить капли на вортексе.
3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции.
5. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки для исследуемых и контрольных образцов
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Проба, экстрагированная из ОКО	в пробирку для образца ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)
К2 ВПЧ 6/11 *(при проведении качественного и количественного анализа)*	в пробирку для образца К2
К1 ВПЧ 6/11 *(при проведении только количественного анализа)*	в пробирку для образца К1

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

6. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[1], Cy5	

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

7. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

[1] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Лист регистрации изменений

Изм.	Номера листов				Всего листов в документе	Номер извещения об изменении	Изменения внес	Дата
	изменённых	заменённых	новых	аннулированных				
1	-	1 - 4	5	-	5	09286667.038.4/6-2021	Л.М. Самигуллина	27.08.21

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

АмплиПрайм

НекстБИО
Биотехнологическая компания

Краткое руководство

по применению набора реагентов для качественного и количественного определения и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 генотипов методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» по ТУ 21.20.23-036-09286667-2020

«АмплиПрайм® ВПЧ 6/11»

Форма выпуска 3

REF P2046-43

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

IVD

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru (для ее получения необходим свободный бесперебойный доступ в интернет).

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ мазки со слизистой оболочки влагалища (помещенные в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (помещенный в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (помещенный в транспортную среду для жидкостной цитологии);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры (помещенный в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки.

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь ВПЧ 6/11	Прозрачная жидкость, раскапана под парафин	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]
ПЦР-буфер-К	Прозрачная жидкость красного цвета	1,20	1 пробирка
К1 ВПЧ 6/11	Прозрачная жидкость	0,12	1 пробирка
К2 ВПЧ 6/11		0,12	1 пробирка
ОКО		1,10	1 пробирка
К-		0,26	1 пробирка
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	форма выпуска 3
Инструкция по применению	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: www.nextbio.ru
Краткое руководство	в бумажном виде
Комплект вкладышей	в бумажном виде

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С ... 8°С в защищенном от света месте

[1] Пробирки с голубым парафином не используются.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ВНИМАНИЕ! Для материала, взятого в транспортную среду для жидкостной цитологии, требуется предварительная подготовка.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ, ВЗЯТЫХ В ТРАНСПОРТНУЮ СРЕДУ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ЦИТОЛОГИИ

Отобрать аликвоту клеток для исследования методом ПЦР одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовую пробирку. Рекомендуется отобрать аликвоту клеток сначала для ПЦР-исследования, после – для проведения жидкостной цитологии.

ПОДГОТОВКА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ВЫБРАТЬ ОДИН ИЗ ВАРИАНТОВ)

Вариант 1

1. Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток и оставить на 12 часов для осаждения клеток.
2. Аккуратно из раствора отобрать **0,5 – 1,0 мл осевших клеток** со дна флакона и перенести в чистую пробирку объемом 1,5 мл, на пробирке указать название образца.
3. Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.
4. Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок. В пробирке должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

Вариант 2

1. Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток.
2. Аккуратно из раствора отобрать **2 – 5 мл клеточной суспензии** (в зависимости от ее плотности) и перенести в чистую пробирку объемом 5 мл, на пробирке указать название образца.
3. Пробирки с образцами центрифугировать при **600 g** (3000 об/мин) **не менее 10 минут** или оставить пробирки в штативе при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) на 12 часов для осаждения клеток.
4. Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок.
5. В пробирке на 5 мл должно остаться 900 - 1000 мкл осадка. Перенести в чистую пробирку на 1,5 мл весь объем осадка.
6. Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.
7. Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки аналогично п. 4. В пробирке на 1,5 мл должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

ОТМЫВКА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

1. В каждую пробирку с осадком клеток внести по **1 мл М-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ». Тщательно перемешать пробирки на вортексе и поставить осаждаться на **30 мин** в штативе.

ВНИМАНИЕ! Если по истечении 30 минут в пробирке видны следы не растворившейся слизистой пробки, необходимо дополнительно перемешать пробирку на вортексе и оставить в штативе еще на 15 мин.

2. Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин**.
3. Аккуратно удалить надосадочную жидкость по стенке пробирки, не захватывая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Оставить 100 - 200 мкл осадка.
4. В каждую пробирку внести по **1 мл Ф-буфера** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно перемешать на вортексе.
5. Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин**.
6. Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. 4. Оставить 100 - 200 мкл осадка. Далее, аккуратно удалить остаток надосадочной жидкости, не захватывая осадок, из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром на 200 мкл, используя автоматический дозатор.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7. В каждую пробирку с осадком клеток внести по **100 мкл Ц-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно ресуспендировать осадок пипетированием, используя отдельный наконечник с фильтром на 200 мкл для каждой пробы. Пробирки перемешать на вортексе.
8. Инкубировать пробы **не менее 2 часов (допускается оставить на ночь)** при температуре **60 ºС**.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОКО (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с ПЦР-смесью ВПЧ 6/11 для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции.
2. Внести в подготовленные пробирки ПЦР-буфер-К и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 10 мкл	
ПЦР-буфер-К	в пробирки с ПЦР-смесью ВПЧ 6/11 на поверхность парафина **ВНИМАНИЕ!** ПЦР-буфер-К не должен проваливаться под парафин.
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Проба, экстрагированная из ОКО	в пробирку для образца ОК (отрицательного контроля экстракции)
Реагент К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)
К2 ВПЧ 6/11 *(при проведении качественного и количественного анализа)*	в пробирку для образца К2
К1 ВПЧ 6/11 *(при проведении только количественного анализа)*	в пробирку для образца К1

3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[2], Cy5	

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow, VIC.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT-Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/;

- в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Лист регистрации изменений

Изм.	Номера листов				Всего листов в документе	Номер извещения об изменении	Изменения внес	Дата
	изменённых	заменённых	новых	аннулированных				
1	-	1 - 4	5	-	5	09286667.038.4/6-2021	Л.М. Самигуллина	27.08.21

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Пронумеровано, скреплено и прошито
16 лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с ограниченной ответственностью «НекстБио»

О.О. Лавинюков

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «НекстБио»

_____ О. О. Лавинюков

27.08.2021

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ДНК ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 6 И 11 ГЕНОТИПОВ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» «АМПЛИПРАЙМ® ВПЧ 6/11» ПО ТУ 21.20.23-036-09286667-2020

Инструкция по применению версии 27.08.21

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Руководитель отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»

_____ М. Н. Гарас

27.08.2021

Младший специалист по документации отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»

_____ Л. М. Самигуллина

27.08.2021

Директор научно-производственного комплекса ООО «НекстБио»

_____ М. Е. Сенина

27.08.2021

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

АмплиПрайм

IVD

Набор реагентов для качественного и количественного определения и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 генотипов методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» по ТУ 21.20.23-036-09286667-2020

АмплиПрайм® ВПЧ 6/11

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

НекстБИО
Биотехнологическая компания

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ 3
1. НАЗНАЧЕНИЕ 4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 4
2.1.Формы выпуска, состав и комплектность 4
2.2.Принцип метода 6
2.3.Прослеживаемость значений калибраторов К1 ВПЧ 6/11 и К2 ВПЧ 6/11 7
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА 7
3.1.Внутренний контроль качества 7
3.2.Рекомендуемые контрольные материалы 8
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ 9
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ 9
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ 11
6.1.Взятие исследуемого материала 11
6.2.Предварительная подготовка исследуемого материала 11
6.3.Экстракция ДНК из исследуемых образцов 12
6.4.Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов 12
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ 13
7.1.Мазки со слизистой оболочки влагалища 13
7.2.Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала 14
7.3.Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры 16
7.4.Соскобы эпителия со слизистой оболочки прямой кишки 16
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 17
8.1.Экстракция ДНК из исследуемого материала 17
8.2.Подготовка реагентов для амплификации 17
8.3.Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции 18
8.4.Анализ и вычисление результатов 19
8.5.Интерпретация результатов 20
8.6.Возможные ошибки 22
8.7.Диагностическое значение полученного результата 22
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 22
9.1.Предел обнаружения 22
9.2.Линейный диапазон измерения и предел измерения 23
9.3.Аналитическая специфичность 23
9.4.Воспроизводимость и повторяемость измерения 24
9.5.Правильность измерения 25
9.6.Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность 26
9.7.Оценка влияния интерферирующих веществ 27
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА 28
10.1. Срок годности 28
10.2. Транспортирование 28
10.3. Хранение 28
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 28
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 29

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	–	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВКО	–	внутренний контрольный образец
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	–	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	–	дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
ВПЧ	–	вирус папилломы человека
К1	–	калибровочный образец 1, положительный контроль ПЦР
К2	–	калибровочный образец 2, положительный контроль ПЦР
К-	–	отрицательный контроль ПЦР
ОКО	–	отрицательный контрольный образец экстракции
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РУ	–	регистрационное удостоверение
РШМ	–	рак шейки матки
ТУ	–	технические условия
УДГ	–	урацил-ДНК-гликозилаза

НАИМЕНОВАНИЕ ИЗДЕЛИЯ

Набор реагентов для качественного и количественного определения и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 генотипов методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» по ТУ 21.20.23-036-09286667-2020.

Далее по тексту употребляется краткое наименование: Набор реагентов «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11», а также сокращение Набор реагентов.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» предназначен для качественного и количественного определения ДНК ВПЧ 6 и 11 генотипов, которые относятся к генотипам низкого онкогенного риска, при этом являются неассоциированными с развитием рака шейки матки (РШМ). Набор позволяет выявлять ВПЧ 6 и 11 генотипов в биологическом материале (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса), в том числе забранный в транспортную среду для жидкостной цитологии), прямой кишки) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.2. Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в разделе инструкции «Дополнительное оборудование и материалы».

1.3. Функциональное назначение: Изделие предназначено для диагностики *in vitro* (выявление, количественное определение и дифференциация ДНК ВПЧ 6 и 11 генотипов методом ПЦР в биологическом материале человека).

1.4. Показания к проведению исследования: Набор реагентов используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекций урогенитального тракта всех групп населения. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания. В связи с тем, что 6 и 11 генотипы входят в состав квадривалентной вакцины, защищающей от инфицирования ВПЧ 6, 11, 16 и 18 генотипами, выявление ВПЧ 6 и 11 генотипов может быть также использовано для оценки эффективности вакцинопрофилактики РШМ и доброкачественных генитальных образований.

1.5. Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов.

1.6. Потенциальные пользователи: Набор реагентов должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом (врачи клинической лаборатории и медицинские лабораторные техники, обученные молекулярным биологическим методикам).

1.7. Применять набор реагентов строго по назначению согласно инструкции по применению.

1.8. Противопоказания к применению: Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Формы выпуска, состав и комплектность

Набор выпускается в трех формах (состав форм и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно). Все три формы предназначены для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени». Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Форма выпуска 1 включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Форма выпуска 2 включает смесь для проведения ПЦР в пробирке объемом 1,5 мл для дозирования в любые типы пробирок. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Форма может быть использована совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Форма выпуска 3 включает смесь для проведения ПЦР, раскапанную под прослойку парафина по стрипованным (12,5 стрипов по 8 пробирок) пробиркам объемом 0,2 мл. Форма предназначена для применения совместно с амплификаторами планшетного типа и рассчитана на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
Форма выпуска 1			
ПЦР-смесь ВПЧ 6/11	0,01	100 пробирок	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана под парафин.
ПЦР-буфер-К	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
К1 ВПЧ 6/11	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 ВПЧ 6/11	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 2			
ПЦР-смесь ВПЧ 6/11	1,20	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
ПЦР-буфер-Н	0,65	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
К1 ВПЧ 6/11	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 ВПЧ 6/11	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Форма выпуска 3			
ПЦР-смесь ВПЧ 6/11	0,01	100 пробирок (12,5 стрипов по 8 пробирок)[1]	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость, раскапана в стрипованные пробирки под парафин белого цвета.

[1] Пробирки с голубым парафином не используются.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-буфер-К	1,20	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость красного цвета.
К1 ВПЧ 6/11	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 ВПЧ 6/11	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов (форма выпуска 1, 2 или 3)	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Комплект вкладышей к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru	-

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной реакции амплификации участков ДНК выявляемых генотипов ВПЧ и ДНК β-глобинового гена человека при помощи специфичных к этим участкам праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

Количественное определение ДНК ВПЧ основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). При проведении количественного теста, амплификация ДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с калибраторами К1 ВПЧ 6/11 и К2 ВПЧ 6/11 – образцами с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

Полученное значение концентрации ДНК ВПЧ нормируется на 100 000 клеток человека для снижения влияния качества забора материла.

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации в одной пробирке одновременно амплифицируются участки ДНК ВПЧ 6, ВПЧ 11 и последовательность ДНК β-глобинового гена человека. Результаты амплификации регистрируются по трем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G[2]	Cy5
ДНК-мишень	ДНК *HPV* 6	ДНК *HPV* 11	ДНК ВКО Glob
Область амплификации	E7 gene	L1 gene	β-глобин

2.3. Прослеживаемость значений калибраторов К1 ВПЧ 6/11 и К2 ВПЧ 6/11

Измерение значений концентрации калибраторов К1 ВПЧ 6/11 и К2 ВПЧ 6/11 производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов К1 ВПЧ 6/11 и К2 ВПЧ 6/11 составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контрольный образец (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать: отрицательный контроль (К-) и положительные контроли (Калибратор К1 6/11 и Калибратор К2 6/11). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должно детектироваться ДНК ВПЧ. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, и контроля, начиная с этапа экстракции.

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow и VIC.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

В качестве положительного контроля этапа ПЦР используются реагенты калибратор К1 ВПЧ 6/11 и К2 ВПЧ 6/11, входящие в состав набора. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей, начиная с этапа ПЦР.

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации ДНК ВПЧ и ДНК β-глобинового гена человека в исследуемых образцах проводится относительно количественно охарактеризованных калибровочных образцов К1 ВПЧ 6/11 и К2 ВПЧ 6/11. Исследование калибровочных образцов К1 ВПЧ 6/11 и К2 ВПЧ 6/11 проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа ПЦР. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов К1 ВПЧ 6/11 и К2 ВПЧ 6/11 и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных образцов К1 ВПЧ 6/11 и К2 ВПЧ 6/11 и исследуемых образцов. Эффективность калибровки должна укладываться в заданный диапазон. Если эффективность калибровки выходит за пределы граничных значений, необходимо повторить исследование с этапа ПЦР.

3.1.3. Контроль качества забора материала

Для оценки качества забора биоматериала и контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование эндогенного ВКО - ДНК β-глобинового гена человека, который присутствует в каждом исследуемом образце, содержащем клинический материал от человека, и контрольных калибраторах. Результаты исследования ДНК β-глобинового гена человека должны соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не обнаружена ДНК β-глобинового гена человека или обнаружена менее 500 копий/мл, то результаты исследования данных образцов считаются недостоверными, требуется повторить анализ, начиная с этапа забора материала.

3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09. Также для предотвращения контаминации лаборатории или в качестве мер по деконтаминации рабочих зон рекомендуется использовать раствор для дезактивации нуклеиновых кислот, например, «Олигатор» производства ООО «НекстБио», Россия.

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК ВПЧ.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. Набор предназначен для профессионального применения. Набор должен использоваться только квалифицированным, обученным (в области клинической лабораторной диагностики) персоналом.

4.5. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требованиям, указанным в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

4.6. При наличии в соскобном материале из прямой кишки значительного количества предопухолевых или опухолевых клеток, интерпретировать результаты количественной оценки нельзя, так как в таких клетках возможно изменение копийности гена HBB.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» и 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».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[3], биологический материал[4], включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Формы выпуска, состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21).

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

---

[3] Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

[4] Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Транспортная среда с муколитиком, зарегистрированная в РФ, предназначенная для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки), содержащая консервант.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошла следующая транспортная среда: «АмплиПрайм® ТСМ» (РУ № ФСР 2012/14205).

6.1.2. Транспортная среда, зарегистрированная в РФ, предназначенная для взятия, транспортирования и хранения биологического материала для жидкостной цитологии (соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала), содержащая консервант, спирты, натрий-фосфатный буферный раствор, солевые растворы и др.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошла следующая транспортная среда: «EASYPREP®», входящая в состав «Набора реагентов EASYPREP® для хранения и подготовки цитологических образцов гинекологических для in vitro диагностики».

6.1.3. Зонд для взятия биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), однократного применения, стерильный.

6.1.4. Щетка эндоцервикальная для взятия биологического материала для жидкостной цитологии (соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала) однократного применения, стерильная.

6.1.5. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 5,0 мл, для взятия биологического материала для жидкостной цитологии.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала

6.2.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 5 мл.

6.2.2. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

6.2.4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

6.2.5. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и 5 мл.

6.2.6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.7. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.2.8. Центрифуга -вортекс.

6.2.9. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса, в том числе в транспортную среду для жидкостной цитологии), соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), прямой кишки) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;

- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;

- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;

- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 100 мкл.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие наборы реагентов для экстракции ДНК: «МагноПрайм ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043), «МагноПрайм ВПЧ» (РУ № РЗН 2020/12397).

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов (при использовании формы выпуска 2):

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя, - при использовании формы выпуска 2 в случае приготовления реакционной смеси с использованием автоматической станции.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного либо планшетного типа, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- наличие 3 или более независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, Cy5 со следующими характеристиками:

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
Cy5	620	640	660	690

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°С;
- точность поддержания температуры ≤ ±0,4°С;
- скорость нагрева не менее 2 °С/сек;
- скорость охлаждения не менее 1 °С/сек.

В ходе проведения клинических испытаний валидацию прошли следующие программируемые амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени»: Rotor-Gene Q (РУ № ФСЗ 2010/07595), Applied Biosystems QuantStudio 5 (РУ № РЗН 2019/8446), C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96 (РУ № ФСЗ 2008/03399).

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °С.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса), в том числе забранный в транспортную среду для жидкостной цитологии), прямой кишки.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.1. Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести из заднебокового свода влагалища с помощью стерильного одноразового зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии инструкцией по применению зонда. Необходимо максимально полно собрать отделяемое. Рабочую поверхность зонда поместить в транспортную среду, обломав пластиковую основу. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Внимание! Во избежание контаминации, нельзя обрезать зонд ножницами!

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – не более 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – в течение 1 года;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.2. Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

7.2.1. Взятие материала

Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном.

Взятие материала провести из цервикального канала:

- с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощетки или универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии инструкцией по применению цитощетки / зонда;
- с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощетки в пробирку с транспортной средой для жидкостной цитологии в соответствии инструкцией по применению цитощетки.

При использовании универсального зонда объем соскобного отделяемого будет меньше.

Допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – не более 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – в течение 1 года;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.2.2. Предварительная подготовка образцов, взятых в транспортную среду для жидкостной цитологии

Отобрать аликвоту клеток для исследования методом ПЦР одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовую пробирку. Рекомендуется сначала отобрать аликвоту клеток для ПЦР-исследования, после отобрать аликвоту клеток – для проведения жидкостной цитологии.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7.2.2.1. Подготовка эпителиальных клеток (выбрать один из вариантов)

Вариант 1

а) Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток и оставить на 12 часов для осаждения клеток.

б) Аккуратно из раствора отобрать **0,5 – 1,0 мл осевших клеток** со дна флакона и перенести в чистую пробирку объемом 1,5 мл, на пробирке указать название образца.

в) Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.

г) Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок. В пробирке должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

Вариант 2

а) Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток.

б) Аккуратно из раствора отобрать **2 – 5 мл клеточной суспензии** (в зависимости от ее плотности) и перенести в чистую пробирку объемом 5 мл, на пробирке указать название образца.

в) Пробирки с образцами центрифугировать при **600 g** (3000 об/мин) **не менее 10 минут** или оставить пробирки в штативе при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) на 12 часов для осаждения клеток.

г) Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок.

д) В пробирке на 5 мл должно остаться 900 - 1000 мкл осадка. Перенести в чистую пробирку на 1,5 мл весь объем осадка.

е) Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.

ж) Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок. В пробирке на 1,5 мл должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

7.2.2.2. Отмывка эпителиальных клеток

а) В каждую пробирку с осадком клеток внести по **1 мл М-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ». Тщательно перемешать пробирки на вортексе и поставить осаждаться на **30 мин** в штативе.

ВНИМАНИЕ! Если по истечении 30 минут в пробирке видны следы не растворившейся слизистой пробки, необходимо дополнительно перемешать пробирку на вортексе и оставить в штативе еще на 15 мин.

б) Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин**.

в) Аккуратно удалить надосадочную жидкость по стенке пробирки, не захватывая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Оставить 100 - 200 мкл осадка.

г) В каждую пробирку внести по **1 мл Ф-буфера** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно перемешать на вортексе.

д) Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин**.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

е) Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. в). Оставить 100 - 200 мкл осадка. Далее, аккуратно удалить остаток надосадочной жидкости, не захватывая осадок, из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром на 200 мкл, используя автоматический дозатор.

ж) В каждую пробирку с осадком клеток внести по **100 мкл Ц-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно ресуспендировать осадок пипетированием, используя отдельный наконечник с фильтром на 200 мкл для каждой пробы. Пробирки перемешать на вортексе.

з) Инкубировать пробы **не менее 2 часов (допускается оставить на ночь)** при температуре **60 ºС**.

7.3. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

Взятие эпителиального соскоба из уретры проводить с помощью стерильного одноразового универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – не более 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – в течение 1 года;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

7.4. Соскобы эпителия со слизистой оболочки прямой кишки

Перед взятием мазка провести тщательный туалет с мылом и водой области вокруг анального отверстия.

Взятие материала провести с поверхности боковых стенок ампулы прямой кишки с помощью одноразового стерильного зонда-тампона из полипропилена/полистирола с вискозой или хлопком, в пробирку с транспортной средой, содержащей изотонический водно-солевой раствор с консервантом, в соответствии с инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи, крови, гноя и каловых масс.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно следующим требованиям:

- при комнатной температуре (до 25 °С) – не более 28 суток;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 месяцев;
- при температуре от минус 24 до минус 16 °С – в течение 1 года;
- при температуре не выше минус 68 °С – в течение 1 года;

либо согласно инструкции к используемой транспортной среде.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории[5]:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОК) в одном повторе.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем исследуемого образца – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **100 мкл**.

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

8.2.1. При использовании формы выпуска 1

8.2.1.1. Отобрать необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесью ВПЧ 6/11** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции.

8.2.1.2. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.1.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

8.2.2. При использовании формы выпуска 2

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.2.1. Рассчитать объемы ПЦР-смеси ВПЧ 6/11 и ПЦР-буфера-Н, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

---

[5] Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 5

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь ВПЧ 6/11	**10,0***(N+1)	**N** – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
ПЦР-буфер-Н	**5,0***(N+1)	

8.2.2.2. Перемешать содержимое пробирки с **ПЦР-смесью ВПЧ-6/11** и **ПЦР-буфером-Н**, осадить капли на вортексе.

8.2.2.3. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

8.2.2.4. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.2.3. При использовании формы выпуска 3

8.2.3.1. Отобрать необходимое количество стрипованных пробирок с **ПЦР-смесью ВПЧ 6/11** для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции.

8.2.3.2. Убедиться, что парафин полностью покрывает раствор на дне пробирок. В противном случае, не использовать данные пробирки.

8.2.3.3. На поверхность парафина внести по **10 мкл ПЦР-буфера-К**, при этом он не должен проваливаться под прослойку парафина и смешиваться с ПЦР-смесью.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**.

8.3.2. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью контрольные образцы.

При проведении качественного анализа:

а) положительный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К2** внести **10 мкл К2 ВПЧ 6/11**.

б) отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) отрицательный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

При проведении количественного анализа:

а) Образец **К1** – в одну пробирку внести **10 мкл К1 ВПЧ 6/11**.

б) Образец **К2** – в одну пробирку внести **10 мкл К2 ВПЧ 6/11**.

в) отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОКО** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

г) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[6], Cy5	

Примечание - С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и вычисление результатов

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по трем каналам детекции (см. таблицу 7).

[6] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow и VIC.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G[7]	Cy5
Продукт амплификации	ДНК ВПЧ генотип 6	ДНК ВПЧ генотип 11	ДНК β-глобинового гена человека (ВКО Glob)

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и заданных значений концентраций для калибраторов строится калибровочная кривая, по которой проводится расчет концентрации ДНК ВПЧ и количество геномов человека на 1 мл исследуемого образца /реакционную смесь. Полученные значения используются для расчета количества ДНК ВПЧ, приходящегося на 10^5 клеток человека. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека. Полученные значения концентраций ДНК человека позволяют оценить качество взятия биологического материала. Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВПЧ производят по формуле:

$$\lg\left(\frac{\text{число копий ДНК ВПЧ в } \mathbf{1} \text{ мл}}{\text{число копий ДНК человека в } \mathbf{1} \text{ мл}} \mathbf{x}\, \mathbf{2} * \mathbf{10^5}\right) = \lg(\text{число копий ДНК ВПЧ на } \mathbf{10^5} \text{клеток человека})$$

где 2 – это коэффициент пересчета количества копий ДНК человека в количество клеток. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека.

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 8 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если результаты, полученные для контрольных образцов, соответствуют критериям валидности, указанным в таблице 10;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения FRT Manager (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия, РУ № РЗН 2019/8870) согласно руководству пользователя, выбрав методику, указанную во вкладыше, прилагаемом к набору. Руководство пользователя размещено на официальном сайте ООО «ИнтерЛабСервис» по адресу: https://www.interlabservice.ru/service/frt/. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 9 и 10 соответственно.

[7] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, Yellow и VIC.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 8

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора **Cy5 не определено** или **определено выше граничного**[8]	**Невалидный**
Значение Ct по каналу для флуорофора **FAM определено не выше граничного** и значение Ct по каналу **Cy5 определено не выше граничного**	**ДНК ВПЧ 6** генотипа **обнаружена**
Значение Ct по каналу для флуорофора **R6G определено не выше граничного** и значение Ct по каналу **Cy5 определено не выше граничного**	**ДНК ВПЧ 11** генотипа **обнаружена**
Значения Ct по каналам для флуорофоров **FAM** и **R6G не определены** или **определены выше граничного значения**, а значение Ct по каналу **Cy5 определено не выше граничного**	ДНК выявляемых ВПЧ **не обнаружена**

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора **Cy5** (ДНК человека) **отсутствует или определено выше граничного**[8], или **определено, но** при этом **рассчитанное количество клеток человека** в исследуемом образце **менее 500** в реакцию	**Невалидный!** Недостаточное количество материала для анализа
Значение Ct по **всем каналам для ВПЧ отсутствует**, значение Ct по каналу для флуорофора **Cy5** (ДНК человека) **определено не выше граничного**, при этом **рассчитанное количество клеток человека** в исследуемом образце **более 500** в реакцию	ДНК выявляемых ВПЧ **не обнаружена**
Менее 3 lg (ВПЧ на 10^5 клеток человека)	**Суммарная концентрация ВПЧ<3 lg**
Выше 3 lg (ВПЧ на 10^5 клеток человека)	**Суммарная концентрация ВПЧ≥3 lg**

ВНИМАНИЕ! При наличии в соскобном материале из прямой кишки значительного количества предопухолевых или опухолевых клеток, интерпретировать результаты количественной оценки нельзя, так как в таких клетках возможно изменение копийности гена HBB.

Таблица 10

Критерии валидности для контрольных образцов

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора		
	FAM	R6G/HEX/JOE/VIC	Cy5
ОКО (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует		
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует		
К1 ВПЧ 6/11 (К1)	Определено значение Ct		
К2 ВПЧ 6/11 (К2)	Определено значение Ct не выше граничного[8]		
К1 ВПЧ 6/11 (К1) К2 ВПЧ 6/11 (К2)	Показатель эффективности (Е) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2		

[8] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для отрицательного контроля (ОКО) по каналу для флуорофора FAM, R6G/HEX/JOE/VIC и Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Для отрицательного контроля (К-) по каналу для флуорофора FAM, и/или R6G/HEX/JOE/VIC и/или Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов.

8.6.3. Если показатель эффективности E для калибраторов не укладывается в диапазон 0,8 – 1,2, необходимо проверить правильность заданных концентраций калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

8.6.4. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

8.6.5. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор и исследование биологического материала.

8.7. Диагностическое значение полученного результата

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения[9]

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью на каждом виде биоматериала и с использованием наборов для экстракции, указанных в пункте 6.3.1. данной инструкции (см. таблицу 11).

Значения характеристики, указанные в таблице 11, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

[9] Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация кДНК выявляемых возбудителей, при которой 95% тестов дают положительный результат).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 11

Предел обнаружения набора

Тип ВПЧ	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл	95%-ый доверительный интервал, копий /мл
ВПЧ 6	$1x10^3$	$7,67x10^2$ - $1,42x10^3$
ВПЧ 11	$1x10^3$	$8,69x10^2$ - $1,85x10^3$

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, приведен в таблице 12. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 12

Линейный диапазон измерения набора

Тип ВПЧ	Линейный диапазон измерения, копий /мл
ВПЧ 6	$3x10^3 – 3x10^8$
ВПЧ 11	

9.3. Аналитическая специфичность

Набор реагентов обнаруживает фрагменты ДНК ВПЧ 6 и 11 генотипов.

Аналитическая специфичность набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов, вирусов (см. таблицу 13) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов в концентрации не менее $1x10^6$ копий/мл, вирусов в концентрации не менее $1x10^5$ копий/мл и геномную ДНК человека вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемые с помощью набора типы ВПЧ. Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми генотипами ВПЧ.

Таблица 13

Микроорганизмы и вирусы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизмы и вирусы	
Candida albicans	*Cytomegalovirus*
Candida glabrata	*Epstein-Barr Virus*
Candida krusei	*Herpes Simplex Virus 2*
Chlamydia trachomatis	*Herpes Simplex Virus 1*
Escherichia coli	ВПЧ 16
Enterobacter aerogenes	ВПЧ 18
Enterobacter cloacae	ВПЧ 31
Haemophilus influenza	ВПЧ 33
Listeria monocytogenes	ВПЧ 35
Mycoplasma genitalium	ВПЧ 39
Neisseria gonorrhoeae	ВПЧ 45
Neisseria meningitides	ВПЧ 51
Staphylococcus saprophyticus	ВПЧ 52
Staphylococcus agalactiae	ВПЧ 56

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Микроорганизмы и вирусы	
Staphylococcus aureus	ВПЧ 58
Shigella flexneri	ВПЧ 59
Shigella sonnei	ВПЧ 66
Salmonella typhi	-
Salmonella enteritidis	-
Salmonella abony	-
Pseudomonas aeruginosa	-

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и геномной ДНК человека с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений с помощью набора оценивали путем тестирования модельных образцов биологического материала, содержащих ДНК выявляемых типов ВПЧ в четырех диапазонах концентраций (см. таблицы 14-17). Модельные образцы были приготовлены разведением стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК выявляемых типов ВПЧ, в биологическом материале, не содержащем ДНК указанных типов ВПЧ. Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов)

Таблица 14

Повторяемость измерения на пределе обнаружения набора

Тип ВПЧ	Исходное значение концентрации, копий/мл	Среднее значение Ct	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CVp), %
Повторяемость, постановка 1, форма 1				
ВПЧ 6	$1x10^3$ до $3x10^3$	36,15	0,43	1,18
ВПЧ 11		36,75	0,21	0,56
Повторяемость, постановка 1, форма 2				
ВПЧ 6	$1x10^3$ до $3x10^3$	36,16	0,43	1,19
ВПЧ 11		36,80	0,13	0,36
Повторяемость, постановка 1, форма 3				
ВПЧ 6	$1x10^3$ до $3x10^3$	36,21	0,44	1,21
ВПЧ 11		36,72	0,15	0,41
Повторяемость, постановка 2, форма 1				
ВПЧ 6	$1x10^3$ до $3x10^3$	36,40	0,38	1,03
ВПЧ 11		36,72	0,16	0,44
Повторяемость, постановка 2, форма 2				
ВПЧ 6	$1x10^3$ до $3x10^3$	36,33	0,43	1,17
ВПЧ 11		36,74	0,16	0,43
Повторяемость, постановка 2, форма 3				
ВПЧ 6	$1x10^3$ до $3x10^3$	36,27	0,44	1,21
ВПЧ 11		36,81	0,16	0,43

Таблица 15

Повторяемость измерения в пределах линейного диапазона набора

Тип ВПЧ	Исходное значение концентрации, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log_{10}	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
ВПЧ 6	$1x10^4$ - $3x10^4$	4,30	0,11	2,67
ВПЧ 11		4,29	0,14	3,32
ВПЧ 6	$1x10^5$ - $3x10^5$	5,28	0,13	2,51
ВПЧ 11		5,29	0,13	2,42
ВПЧ 6	$1x10^6$ - $3x10^6$	6,26	0,14	2,23
ВПЧ 11		6,26	0,14	2,28

Таблица 16

Воспроизводимость измерения на пределе обнаружения набора

Тип ВПЧ	Исходное значение концентрации, копий/мл	Среднее значение Ct	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CVv), %
Воспроизводимость, постановка 1, форма 1				
ВПЧ 6	$1x10^3$ до $3x10^3$	36,25	0,45	1,25
ВПЧ 11		36,79	0,11	0,30
Воспроизводимость, постановка 1, форма 2				
ВПЧ 6	$1x10^3$ до $3x10^3$	36,17	0,39	1,09
ВПЧ 11		36,76	0,17	0,46
Воспроизводимость, постановка 1, форма 3				
ВПЧ 6	$1x10^3$ до $3x10^3$	36,29	0,38	1,05
ВПЧ 11		36,70	0,14	0,37

Таблица 17

Воспроизводимость измерения в пределах линейного диапазона набора

Тип ВПЧ	Исходное значение концентрации, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log_{10}	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
ВПЧ 6	$1x10^4$ - $3x10^4$	4,26	0,14	3,24
ВПЧ 11		4,28	0,15	3,49
ВПЧ 6	$1x10^5$ - $3x10^5$	5,27	0,13	2,48
ВПЧ 11		5,29	0,13	2,36
ВПЧ 6	$1x10^6$ - $3x10^6$	6,28	0,13	2,10
ВПЧ 11		6,28	0,14	2,25

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с помощью набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в 40 повторах (см. таблицу 18).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 18

Правильность измерения

Тип ВПЧ	Среднее значение измерения, log_{10}	Установленное значение концентрации, log_{10}	Систематическая погрешность (B)	
			log_{10}	%
ВПЧ 6	5,64	5,7	0,06	5,64
ВПЧ 11	5,65	5,7	0,05	5,65

9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностической специфичности и чувствительности набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» были использованы 100 образцов отделяемого слизистой оболочки влагалища (мазки) в транспортной среде для мазков, 100 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для жидкостной цитологии, 100 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки уретры (мужские образцы), 100 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки прямой кишки.

В качестве набора сравнения, с помощью которого устанавливали отсутствие ДНК ВПЧ 6 и ВПЧ 11, использовался набор реагентов для выявления, типирования и количественного определения вируса папилломы человека методом ПЦР «HPV квант-4» по ТУ 9398-032-46482062-2019 (РУ № ФСР 2010/08811).

Таблица 19

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования		
Тип	Количество	Образцы	АмплиПрайм® ВПЧ 6/11	Набор сравнения
Мазок со слизистой оболочки влагалища в транспортной среде для мазков	204	Положительных	104	104
		Отрицательных	100	100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для мазков	202	Положительных	102	102
		Отрицательных	100	100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для жидкостной цитологии	201	Положительных	101	101
		Отрицательных	100	100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры (мужские образцы)	202	Положительных	102	102
		Отрицательных	100	100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки	200	Положительных	100	100
		Отрицательных	100	100

Значения диагностической специфичности и чувствительности набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные исходя из полученных данных, приведены в таблице 20.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 20

Диагностическая специфичность набора

Тип образцов	Диагностическая специфичность (с доверительной вероятностью 95%), в интервале, %	Диагностическая чувствительность (с доверительной вероятностью 95%), в интервале, %
Мазок со слизистой оболочки влагалища в транспортной среде для мазков	100% (97,0 – 100)	100% (97,2 – 100)
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для мазков	100% (97,0 – 100)	100% (97,1 – 100)
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для жидкостной цитологии	100% (97,0 – 100)	100% (97,1 – 100)
Соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры (мужские образцы)	100% (97,0 – 100)	100% (97,1 – 100)
Соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки	100% (97,0 – 100)	100% (97,0 – 100)

9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам отделяемого слизистой оболочки влагалища и образцам отделяемого слизистой оболочки прямой кишки на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 21, в максимально возможной концентрации для данных видов биоматериала.

Таблица 21

Интерферирующие вещества, использованные при тестировании набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11»

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
отделяемое слизистой оболочки влагалища	муцин	0,23 мг/100 мкл
	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	мочевина	0,033 ммоль/100 мкл
	лубриканты	5 мкг/100 мкл
	семенная жидкость	5 мкг/100 мкл
	мирамистин	0,001 % действующего вещества в 100 мкл
	итраконазол	6,5 мкг/100 мкл
	метронидазол	5 мкг/100 мкл
	дидрогестерон	5 мкг/100 мкл
	прогестерон	5 мкг/100 мкл
отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	гликохолат натрия	11,1 нг/100 мкл
	натрий таурохолат гидрат	3,8 нг/100 мкл
	хлорофилл	0,26 мкг/100 мкл

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® ВПЧ 6/11» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Не допускать попадания солнечного света
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Лист регистрации изменений

Изм.	Номера листов				Всего листов в документе	Номер извещения об изменении	Изменения внес	Дата
	изменённых	заменённых	новых	аннулированных				
1	-	2 - 33	34	-	34	09286667.035. 1/2-2021	Л.М. Самигуллина	19.02.21
2	-	1 - 30	-	-	30	09286667.038. 1/6-2021	Л.М. Самигуллина	27.08.21

Пронумеровано, скреплено и прошито
30 лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с ограниченной ответственностью «НекстБио»

О.О. Лавинюков

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU