

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2022 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

«РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип» предназначен для качественного дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска (ВКР) в клинических образцах (соскобах эпителиальных клеток с поверхности шейки матки и цервикального канала) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени. Набор может быть использован при диагностике папилломавирусной инфекции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения ПЦР.

Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq ДНК-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридационного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя ин-

фекции, который в ходе реакции связывается с одной из цепей ДНК, обеспечивая также дополнительную специфичность метода. ДНК-зонд содержит на 5'-конце флуоресцентный краситель, а на 3'-конце – гаситель флуоресценции, значительно снижающий интенсивность флуоресценции. В ходе полимеразного синтеза комплементарной цепи, благодаря 5'-3'-нуклеазной активности Taq ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством целевой ДНК в образце.

Для анализа содержания ДНК ВПЧ ВКР в одном образце используется четыре пробирки, содержащие ГРС 1, 2, 3, 4, в каждой из которых осуществляется амплификация ДНК трёх из 12 типов ВПЧ (см. таблицу 1).

Таблица 1.

Пробирка	Типы ВПЧ
ГРС 1	16, 18, 39
ГРС 2	33, 45, 56
ГРС 3	31, 35, 58
ГРС 4	52, 51, 59

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением целевой ДНК из клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО) – ГРС 1, 2, 3.

В анализируемых образцах дополнительно оценивается содержание ДНК гена β -актина человека с целью валидации качества забора материала и повышения достоверности результатов определения ДНК ВПЧ ВКР – ГРС 4.

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) <i>Описание.</i>	Количество
Положительный контрольный образец (ПКО) <i>Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)</i>	2 пробирки по 1 мл
Готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС 1, 2, 3, 4) <i>Лиофилизированная</i>	4 планшета по 96 пробирок
Оптическая пленка	5 листов
Вкладыш со штрих-кодом	1 шт.

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из клинических образцов (соскобы эпителиальных клеток) с использованием наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор» производства АО «Вектор-Бест».

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Набор рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

Показания к применению.

Набор может быть использован при диагностике папилломавирусной инфекции.

Противопоказаний к применению медицинского изделия нет (не применимо).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность:

За аналитическую чувствительность принята величина концентрации целевой ДНК, для которой при экспериментальной проверке на двух сериях набора на 40 повторях для каждой серии и каждого из заявленных амплификаторов и наборов для выделения ДНК был получен положительный результат в 100% случаев.

Набор гарантированно выявляет ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска в концентрации 100 копий в ПЦР-пробе (соответствует $1,2 \times 10^4$ копий ДНК/мл исходного образца при использовании для выделения ДНК наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор») и ДНК гена β -актина человека в концентрации 250 копий в ПЦР-пробе (соответствует 3×10^4 копий ДНК/мл исходного образца при использовании для выделения ДНК наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор»), что подтверждается при выпуске каждой серии набора реагентов тестированием образцов, приготовленных из стандартных образцов предприятия с соответствующим содержанием вирусной ДНК.

3.2. Аналитическая специфичность:

Был проведен *in silico* анализ последовательностей праймеров и зондов по базам последовательностей микроорганизмов и вирусов, которые могут присутствовать в урогенитальном тракте человека (*Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Lactobacillus species*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella species*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, *Candida albicans*, ЦМВ, ВЭБ, ВПГ-1 и ВПГ-2, ВГВ, ВГС, ВИЧ), а также ВПЧ других типов. Возможность перекрестных реакций исключена.

Аналитическая специфичность дифференциального выявления ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов была подтверждена отсутствием перекрестных ложноположительных сигналов при анализе образцов, содержащих возбудители других урогенитальных заболеваний (ВПЧ 26, 53, 66, 68, 73, 82, 6, 11, 44 типов, *Mycoplasma hominis*,

Mycoplasma genitalium, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma species*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, ЦМВ, ВПГ-1,2, ВЭБ, *Lactobacillus species*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella species*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*).

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 16 типа: клинические испытания, проведенные на 105 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 16 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 96,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 18 типа: клинические испытания, проведенные на 51 положительном образце, содержащем ДНК ВПЧ 18 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 93,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 31 типа: клинические испытания, проведенные на 71 положительном образце, содержащем ДНК ВПЧ 31 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 94,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 33 типа: клинические испытания, проведенные на 48 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 33 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 92,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 35 типа: клинические испытания, проведенные на 48 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 35 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 92,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 39 типа: клинические испытания, проведенные на 48 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 39 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 92,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 45 типа: клинические испытания, проведенные на 49 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 45 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 92,8 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 51 типа: клинические испытания, проведенные на 57 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 51 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 93,7 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 52 типа: клинические испытания, проведенные на 77 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 52 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 95,3 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 56 типа: клинические испытания, проведенные на 59 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 56 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 93,9 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 58 типа: клинические испытания, проведенные на 60 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 58 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 94,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 59 типа: клинические испытания, проведенные на 48 положительном образце, содержащем ДНК ВПЧ 59 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 92,6 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 16 типа: клинические испытания, проведенные на 357 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 16 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 18 типа: клинические испытания, проведенные на 411 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 18 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 31 типа: клинические испытания, проведенные на 391 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 31 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 33 типа: клинические испытания, проведенные на 414 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 33 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 35 типа: клинические испытания, проведенные на 414 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 35 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 39 типа: клинические испытания, проведенные на 414 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 39 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 45 типа: клинические испытания, проведенные на 413 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 45 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 51 типа: клинические испытания, проведенные на 405 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 51 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 52 типа: клинические испытания, проведенные на 385 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 52 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 56 типа: клинические испытания, проведенные на 403 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 56 типа, пока-

зали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 58 типа: клинические испытания, проведенные на 402 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 58 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 59 типа: клинические испытания, проведенные на 414 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 59 типа, показали 100 % специфичность (интервал 99,1 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.5. Воспроизводимость результатов:

При тестировании в независимых постановках разными операторами на двух сериях набора образцов в 8 повторах каждый внутрипостановочная, межпостановочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость, межаблаторная воспроизводимость результатов составила 100 %. Коэффициент вариации C_v не более 4 %.

3.6. Потенциально интерферирующие вещества.

В клинических испытаниях показано отсутствие влияния потенциально интерферирующих веществ в образцах соскобов эпителиальных клеток (кровь и муцин до 0,5%) на результаты анализа. Необходимо исключить использование влагалищных свечей, гелей и мазей, компоненты которых по литературным данным (методическим указаниям для врачей) могут влиять на результаты анализа (см. п. 6.1. данной инструкции по применению).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 26 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению ДНК возбудителей ВПЧ, обязаны обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике. К работе с набором допускается только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским, или биологическим образованием, прошедший подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с патогенными для человека микроорганизмами и получивший дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

4.3. ПКО содержит натрия азид в концентрации, указанной в п. 2.2 «Состав набора».

4.4. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.5. При работе с набором необходимо надевать одноразовые медицинские перчатки, использовать только одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов.

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для дезинфекции и предотвращения контаминации все рабочие поверхности и оборудование следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,8% раствор «Дезомакс-Иннова», 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 1% раствор «Мистраль»; 1% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией (см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»).

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с 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»

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени планшетного типа (с каналами детекции: «ROX», «FAM», «HEX», «Cy5»):

«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

– бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, ЗАО «Ламинарные системы», Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;

– мини-шейкер, обеспечивающий частоту вращения 1200-1800 об/мин (например, «PSU-2Т», фирма «BioSan», Латвия или «BioShake iQ» фирма «Analytik Jena», Германия);

– дозаторы одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (например, фирма «Biohit», Финляндия);

- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером (например, фирма «Sartorius», Германия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (например, перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (например, фирма «SSI», США);
- контейнер для сбора отходов (например, «Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»);
- нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

При проведении работ с клиническими образцами в лаборатории, включая процесс выделения НК из них, необходимо обеспечить безопасность работы в соответствии с требованиями законодательства в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия.

Пациент должен быть заранее проинструктирован о правилах подготовки к сдаче урогенитального соскоба: за 2-3 дня до взятия биоматериала необходимо исключить использование влагалищных свечей, гелей и мазей, а также воздержаться от половых контактов. Не проводится взятие материала у женщин во время менструации. При заборе биологического материала из урогенитального тракта не допускать попадания слизи и крови в пробу.

Более подробно с правилами забора биоматериала можно ознакомиться в Методических рекомендациях по лабораторным тестам для студентов медицинских учебных заведений, лечащих врачей, сотрудников процедурных кабинетов и клиничко-диагностических лабораторий «Преаналитический этап лабораторных исследований» Министерства образования и науки (сост.: Кочетов А.Г. с соавт - Москва: РУДН, 2012. – 251 с.).

Забор биоматериала (соскобов эпителиальных клеток с поверхности шейки матки и цервикального канала) необходимо проводить с помощью одноразовых стерильных урогенитальных зондов (зарегистрированных в установленном порядке в РФ) в пробирки с транспортным раствором (компонент наборов: «РеалБест ДНК-экспресс» (РУ № РЗН 2915/2300), «Транспортный раствор» (РУ РЗН 2017/6004), производства АО «Вектор-Бест»).

Для анализа используется ДНК, выделенная из клинических образцов (соскобы эпителиальных клеток) с применением одного из наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест

ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100», «РеалБест УниМаг» и «Лизирующий раствор» производства АО «Вектор-Бест» согласно инструкции по применению соответствующего набора. При использовании набора «РеалБест УниМаг» после элюции добавить в каждую лунку глубоколоночного планшета 100 мкл элюирующего раствора дополнительно.

Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать ПКО, который является компонентом данного набора, и отрицательный контрольный образец (ОКО), который является компонентом набора для выделения.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2-8) °С не более 24 часов.

6.2. Подготовка реагентов.

6.2.1. Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать пробирки с ГРС в упаковке (не вскрывая!) при температуре (18-26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их пленкой.

Для анализа каждого образца (включая контрольные образцы) требуется 4 пробирки, содержащие ГРС 1, ГРС 2, ГРС 3, ГРС 4, соединенные между собой в стрип. Первая пробирка для каждого образца (или каждого стрипа), содержащая ГРС 1, отмечена красной линией, нанесенной на пленку. Далее идут ГРС 2, ГРС 3, ГРС 4 по порядку (см. схему). Также для однозначной идентификации пробирок с ГРС 1, 2, 3, 4 и исключения возможности неправильной установки планшета красная линия нанесена непосредственно на пробирки с ГРС 1 верхнего ряда планшета.

Внимание! Неиспользованные пробирки с ГРС упаковать в пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки ГРС хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

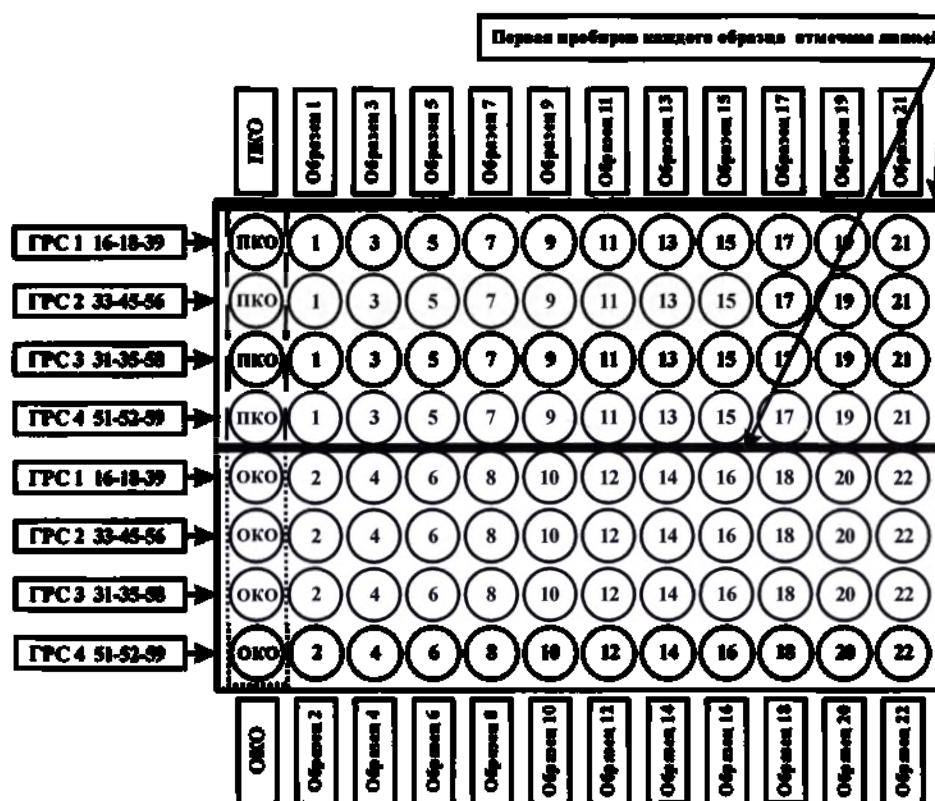
6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2-8) °С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС расположить в штативе (см. схему).

Для анализа каждого образца используются 4 пробирки, содержащие ГРС 1, ГРС 2, ГРС 3, ГРС 4.

Рекомендованный порядок установки пробирок в амплификатор



7.2. Аккуратно удалить плёнку, закрывающую пробирки.

Внимание! При удалении плёнки следите, чтобы вместе с ней не была удалена ГРС.

В каждую пробирку с ГРС дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

7.3. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

Внимание! Нельзя наносить на оптическую плёнку какие-либо надписи. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

Для повышения эффективности и скорости смешения компонентов рекомендуется перемешать содержимое пробирок в мини-шейкере с частотой вращения 1200-1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

7.5. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО, ДНК ВПЧ ВКР, ДНК гена β -актина человека и детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

Протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °C – 2 минуты;

2 стадия: 95 °C – 2 минуты;

3 стадия: 50 циклов (94 °C – 10 секунд, 60 °C – 20 секунд)*.

*Измерение флуоресценции проводить при 60 °C.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО, ДНК ВПЧ ВКР, ДНК гена β -актина человека:

ГРС 1-3:

«Сy5» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«FAM», «HEX» и «ROX» – для регистрации сигналов ДНК ВПЧ ВКР.

ГРС 4:

«Сy5» – для регистрации сигнала ДНК гена β -актина человека;

«FAM», «HEX» и «ROX» – для регистрации сигналов ДНК ВПЧ ВКР.

7.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами и контрольными образцами, согласно инструкции к используемому прибору.

7.8. Запустить амплификатор для выполнения заданного протокола.

7.9. При использовании в КДЛ лабораторной информационной системы (ЛИС) применяется вкладыш со штрих-кодом как идентификатор анализа.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО в каждой из ГРС 1-3 программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Сy5») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;

– нарастание сигналов амплификации ДНК ВПЧ ВКР (каналы «FAM», «HEX», «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО для каждого сигнала.

В ПКО в ГРС 4 программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации ДНК гена β -актина человека (канал «Сy5») и определять значение порогового цикла C_t β -актина;

– нарастание сигналов амплификации ДНК ВПЧ ВКР (каналы «FAM», «HEX», «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО для каждого сигнала.

8.1.2. В ОКО в каждой из ГРС 1-3 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «Сy5») и определять C_t ВКО, при этом по каналам «FAM», «HEX» и «ROX» программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК с C_t меньше или равно 40.

В ОКО в ГРС 4 программа не должна регистрировать нарастания сигнала амплификации ДНК гена β -актина человека (канал «Сy5») с C_t меньше или равно 32. Также по каналам «FAM», «HEX» и «ROX» программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК с C_t меньше или равно 40.

Если для ОКО значение C_t по каналам «FAM» и/или «HEX» и/или «ROX» в любой из ГРС 1-4 меньше или равно 40, и/или значение C_t по каналу «Cy5» в ГРС 4 меньше или равно 32, то это свидетельствует о наличии контаминации (см. п. 8.2.4).

8.1.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (ГРС 1-3) и ДНК гена β -актина человека (ГРС-4) и определять C_t ВКО и C_t β -актина.

Анализируемый образец считается валидным, если для этого образца значение C_t β -актина меньше или равно 32.

Для образцов, признанных невалидными (C_t β -актина в ГРС 4 больше 32) необходимо провести повторный забор материала для исследования.

Валидация образца позволяет оценить правильность забора материала и его хранения. В случае, если эпителиальный соскоб забран неправильно (недостаточное количество эпителиальных клеток) или хранился в условиях, не обеспечивающих сохранность ДНК, сигнал амплификации ДНК гена β -актина человека будет заниженным, и образец будет признан невалидным.

Отрицательный результат выявления ДНК ВПЧ ВКР в таком случае может быть ложным.

8.2. Учёт результатов.

8.2.1 Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО) отдельно для каждой из ГРС 1-3. Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец считается отрицательным, не содержащим ДНК ВПЧ ВКР, если для этого образца значения C_t по каналам «FAM», «HEX» и «ROX» во всех четырех ГРС больше 40 или не определяются.

Если для такого образца значение C_t ВКО превышает значение $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат по данному образцу не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

8.2.3. Анализируемый образец считается положительным, содержащим ДНК ВПЧ ВКР, если для этого образца значение C_t в каком-либо из каналов «FAM», «HEX» и «ROX» (в любой из пробирок с ГРС 1-4) меньше или равно 40. Соответствие результатов анализа типам ВПЧ приведено в таблице 2.

Анализируемые образцы могут содержать ДНК ВПЧ одного или нескольких типов в любых сочетаниях.

Таблица 2.

пробирка	Положительный результат детекции в канале		
	«FAM»	«HEX»	«ROX»
ГРС 1	16 тип	39 тип	18 тип
ГРС 2	33 тип	56 тип	45 тип
ГРС 3	31 тип	58 тип	35 тип
ГРС 4	52 тип	59 тип	51 тип

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по типу ВПЧ, контаминация которым зафиксирована, в данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недо-
стоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контами-
нации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положи-
тельный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный резуль-
тат, следует учитывать, как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспорт-
ных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного
вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не
более 10 суток.

9.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться
при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холо-
дильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной ре-
гистрацией температуры.

9.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение
наборов по истечении срока их годности.

9.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструк-
ции по применению набора.

9.5. Изделие не требует технического обслуживания и не подлежит ремонту.

10. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

10.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям
нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

10.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, воз-
никших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хране-
ния, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

10.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

тел.: (383) 252-51-62, 227-60-30; тел./факс: (383) 252-51-81, 252-51-77;

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 252-51-75.

Начальник отделения
производства ПЦР-наборов
АО «Вектор-Бест»



А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России
д.м.н., профессор



Т.И. Поспелова

м.п.

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 4 листов.
Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России

Захарова Л.Н.
“ 21 ” 20 20 г.

