

УТВЕРЖДАЮ



Директор ООО НПФ «Литех»

А.Ю.Наумов

2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению медицинского изделия для диагностики *in vitro*

Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК онкогенных типов *Human papillomavirus* методом полимеразной цепной реакции
КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП** предназначен для одновременного выявления, идентификации и количественного определения ДНК онкогенных типов *Human papillomavirus* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в пробах нуклеиновых кислот (НК), выделенных из клинических образцов (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта).

Функциональное назначение – Набор реагентов **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП** предназначен для диагностики папилломавирусной инфекции (выявления ДНК онкогенных типов *Human papillomavirus*), ассоциированной с поражением клеток эпителия шейки матки. В рамках диагностики папилломавирусной инфекции с помощью набора **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП** можно проводить генотипирование вирусов папилломы человека (ВПЧ) и определять уровень вирусной нагрузки ВПЧ в клетках слизистых оболочек урогенитального тракта.

Полученные результаты не являются основанием для постановки диагноза, а используются только в сочетании с другими лабораторными показателями и диагностической информацией.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА – клиническая лабораторная диагностика.

Показания к применению. Набор реагентов **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП** может быть использован в лабораторной диагностике папилломавирусной инфекции для выявления, генотипирования и количественного определения возбудителя инфекции.

3. ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ НАБОРА - сотрудники клинико-диагностических лабораторий, прошедшие соответствующую профессиональную подготовку в области ДНК-диагностики.

4. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

4.1. Состав набора

Набор **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП** выпускается в 2 вариантах исполнения. Варианты исполнения набора различаются количеством выявляемых типов *Human papillomavirus* (табл. 1).

ВПЧ ГЕНОТИП-8 TwoStep-PB предназначен для диагностики всей линейки известных онкогенных типов *Human papillomavirus* (16, 31, 33, 35, 52, 58, 18, 45, 39, 59, 51, 56, 66, 68, 26, 53, 73, 82, 30, 70, 67, 6, 11, 44).

ВПЧ ГЕНОТИП-4 TwoStep-PB предназначен для диагностики часто встречающихся онкогенных типов (16, 31, 33, 35, 52, 58, 18, 45, 39, 59, 51, 56).

Набор рассчитан на проведение ПЦР - анализа 24 образцов, включая контрольные, и последующей флуоресцентной детекции амплифицированного фрагмента ДНК методом гибридизации с зондами «в реальном времени» на адаптированных для этого приборах.

Таблица 1.

№	Вариант исполнения	Состав	Варианты фасовки
1	ВПЧ ГЕНОТИП-8 TwoStep-PB	1. Реакционная смесь 16+18+45 2. Реакционная смесь 31+33+35 3. Реакционная смесь 52+58+51 4. Реакционная смесь 39+59+56 5. Реакционная смесь 26+66+68 6. Реакционная смесь 53+73+82 7. Реакционная смесь 30+70+67 8. Реакционная смесь 6+11+44 9. Раствор Таq-полимеразы 10. Разбавитель 11. ПКО ВПЧ ГЕНОТИП	24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 2 пробирки по 800мкл 2 пробирки по 1 мл 2 пробирки по 200 мкл
2	ВПЧ ГЕНОТИП-4 TwoStep-PB	1. Реакционная смесь 16+18+45 2. Реакционная смесь 31+33+35 3. Реакционная смесь 52+58+51 4. Реакционная смесь 39+59+56 5. Раствор Таq-полимеразы 6. Разбавитель 7. ПКО ВПЧ ГЕНОТИП	24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 24 пробирки по 21 мкл 1 пробирка - 800 мкл 1 пробирка – 1 мл 1 пробирка – 200 мкл

В состав комплектаций набора входят готовые к применению реагенты.

В состав каждой реакционной смеси входят:

- раствор дНТФ;
- ПЦР-буфер;
- флуоресцентные зонды: зонд для специфического фрагмента генома одного типа ВПЧ содержит флуорофор FAM, зонд для специфического фрагмента генома второго типа ВПЧ содержит флуорофор ROX, зонд для специфического фрагмента генома третьего типа ВПЧ содержит флуорофор Cy5, зонд для внутреннего контроля содержит флуорофор HEX.

- праймеры для выявления ДНК ВПЧ соответствующих типов; в качестве гена-мишени ВПЧ всех заявленных генотипов используются онкогены Е6 или Е7.

- праймеры для выявления внутреннего контроля (геномная ДНК человека); внутренний контроль позволяет контролировать процесс прохождения реакции амплификации, а также тестировать наличие в пробах веществ, ингибирующих полимеразную цепную реакцию и качество выделения ДНК. В качестве гена-мишени используется ген **б-глобина человека**.

Для проведения исследования Реакционная смесь требует внесения Раствора Таq-полимеразы, входящей в состав комплекта.

ПКО ВПЧ ГЕНОТИП представляет собой количественно охарактеризованную смесь ДНК-калибраторов (образцов ДНК-мишеней геномов ВПЧ и человека известной концентрации) в диапазоне $5 \times 10^6 - 5 \times 10^4$ ГЭ/мл. Во вкладыше к каждой серии набора реагентов указана точная концентрация соответствующего калибратора в образце ПКО ВПЧ ГЕНОТИП, а также диапазон допустимых значений циклов пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (Ct) для ПКО ВПЧ ГЕНОТИП на различных типах амплификаторов.

4.2. Принцип метода

Набор реагентов **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП** основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК ВПЧ путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции.

Гибридизационно-флуоресцентная детекция позволяет проводить регистрацию продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени»). Детекция продуктов амплификации проводится в реакционном растворе. Олигонуклеотидный зонд, несущий флуоресцентную метку, специфически гибридизуется с ампликоном. В ходе последующей элонгации происходит разрушение зонда и высвобождение флуоресцентной метки в раствор, что делает возможным её регистрацию на флуоресцентном детекторе.

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводятся в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Cycle threshold, Ct). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце.

Возможность количественного определения ДНК ВПЧ в режиме «реального времени» основывается на существовании зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (Ct).

В идеальном случае на каждом температурном цикле реакции количество нарабатываемой ДНК удваивается, т.е. количество продуктов реакции на цикле n равно начальному числу молекул, умноженному на 2^n :

$$N_n = N_0 2^n$$

где n – номер цикла реакции; N_0 – количество целевых молекул в начале реакции (на первом

цикле); N_n – количество продуктов реакции на цикле n ; 2 – эффективность реакции (в оптимальных условиях эффективность ПЦР действительно близка к 2).

Для проведения количественного теста амплификацию ДНК из исследуемых образцов проводят одновременно с положительным контрольным образцом с известной концентрацией ДНК-мишени.

Для сравнения графиков, полученных при проведении ПЦР «в реальном времени», используют один из двух основных подходов к анализу результатов: пороговый метод (определение значения порогового цикла реакции Ct, как точки пересечения графика накопления ДНК и пороговой линии) или метод прямого сравнения графиков (определение значения некоторой точки C_p , crossing point, на графике накопления ДНК по форме кривой, например – метод максимума второй производной). Оба подхода предполагают нахождение некоторого значения на оси абсцисс (дробного значения цикла реакции), характеризующего данную кривую (найденное значение обычно обозначают как Ct в случае пороговых методов или C_p для методов, использующих анализ формы кривой). Полученные значения используют далее при сопоставлении результатов ПЦР для разных образцов. Суть порогового метода заключается в том, чтобы определить момент Ct (выраженный в циклах ПЦР), когда количество ДНК в реакционной пробирке (а, следовательно, и флуоресцентный сигнал) достигает одинаковой для всех образцов пороговой величины (задается пользователем или программным обеспечением). Сравнивая полученные значения Ct, можно судить о начальных концентрациях ДНК в исследуемых образцах. Чем меньше Ct, (т.е. чем быстрее количество ДНК в данном образце достигло пороговой величины), тем больше было в нем целевой ДНК в начальный момент времени. Зная пороговый цикл Ct для положительного контрольного образца (ПКО) с известной начальной концентрацией $C_{пко}$, можно вычислить относительную начальную концентрацию неизвестных образцов.

Формулы для расчета концентрации ДНК в анализируемом образце представлены в п. 11.3.

4.3. Метрологическая прослеживаемость значений концентрации калибраторов, входящих в состав ПКЧ ВПЧ ГЕНОТИП, проведена до уровня контрольных образцов предприятия (калибраторы первого порядка), изготовленных из геномной ДНК ВПЧ. Концентрацию контрольных образцов предприятия определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации образцов с использованием метода цифровой ПЦР. Коммутательность контрольных образцов предприятия подтверждена результатами измерения концентрации ДНК референтной и рутинной методиками, предназначенными для измерения показателей концентрации при количественном исследовании ДНК, выделенной из соответствующих клинических образцов.

4.4. Ограничения метода

При наличии мутаций в анализируемой области генома, вследствие ухудшения гибридизации праймеров или зондов с ДНК, могут наблюдаться ложноотрицательные реакции, а также занижение реального содержания ДНК возбудителя в клиническом образце.

5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

5.1. Аналитическая специфичность

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам видоспецифичных генов возбудителей, а также специфичными флуоресцентными олигонуклеотидными зондами для гибридизации с комплементарными участками ампликонов (специфических продуктов амплификации), что исключает перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами и другими инфекционными возбудителями.

Аналитическая специфичность набора реагентов, т.е. способность выявлять только ДНК указанных генотипов ВПЧ, вне зависимости от присутствия в анализируемом образце ДНК других возбудителей, доказана производителем при исследовании ДНК следующих микроорганизмов: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus crispatus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria flava*, *Neisseria subflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria mucosa*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *HSV 1 и 2 типа*, *CMV*, а также геномной ДНК человека. Отсутствие перекрестных реакций между генотипами ВПЧ доказана производителем при исследовании высококонцентрированных образцов ДНК ВПЧ типов 16, 31, 33, 35, 52, 58, 18, 45, 39, 59, 51, 56, 66, 68, 26, 53, 73, 82, 30, 70, 67, 6, 11, 44.

Ложноположительные и ложноотрицательные результаты выявлены не были. Специфичность, рассчитанная как частота ложноположительных результатов для отрицательных проб на целевой маркер, составила 100%.

5.2. Аналитическая чувствительность

С помощью набора КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП можно обнаружить 1×10^3 и более геном-эквивалентов/мл каждого типа ВПЧ, присутствующего в прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе.

5.3. Тест на прецизионность

Тест на прецизионность характеризуется рассеянием значений измеренных концентраций, получаемых при использовании набора относительно величины средней концентрации. Для образцов с концентрацией 10^5 геном-эквивалентов/мл для ВПЧ всех заявленных генотипов коэффициент вариации составляет не более 10%.

5.4. Тест на правильность определения концентрации

Тест на правильность определения – при детекции образцов с концентрациями 2×10^7 , 2×10^5 и 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для ВПЧ всех заявленных генотипов процент отклонения измеренной концентрации от значения, принимаемого за истинное, находится в диапазоне 90-110%.

5.5. Диапазон линейности

Диапазон линейности – это диапазон концентраций, при детекции которых зависимость между значениями Ct и log концентрации удовлетворяет линейной модели. Модуль коэффициента корреляции для образцов с концентрациями 2×10^7 , 2×10^5 и 2×10^3 геном-эквивалентов/мл для ВПЧ всех заявленных генотипов составляет не менее 0,99. Таким образом, диапазон линейности для ДНК ВПЧ всех заявленных генотипов составляет от 2×10^7 до 2×10^3 геном-эквивалентов/мл.

6. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

6.1. Диагностические характеристики:

В ходе клинических испытаний медицинского изделия «Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК онкогенных типов *Human papillomavirus* методом полимеразной цепной реакции КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП», производства ООО НПФ «Литех», Россия, было проведено исследование 1210 образцов клинического материала (отделяемое урогенитального тракта) от пациентов с признаками папилломавирусной инфекции (цервикальной интраэпителиальной неоплазии - CIN) и условно здоровых людей, включая:

1137 образцов отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта от женщин, (мазок шейки матки, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала [211 образцов от женщин в возрасте от 32 до 65 лет с гистологически подтвержденным диагнозом CIN (CIN+); 201 образец от женщин в возрасте от 30 до 53 лет с гистологически подтвержденным отсутствием CIN (CIN-); 725 образцов от женщин в возрасте от 30 до 60 лет без гистологического исследования (CIN?)];

и 73 образца соскоба эпителия со слизистой оболочки уретры от мужчин в возрасте от 35 до 50 лет.

Диагностические характеристики рассчитаны в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008.

Показатели диагностических характеристик для разных генотипов ВПЧ, согласно результатам клинических испытаний, соответствуют значениям, приведенным в таблице (доверительная вероятность, в данном исследовании принята равной 95%).

Таблица 2

Клинический материал	Количество положительных образцов от пациентов	Генотип ВПЧ	Результаты испытаний	
			Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
			(с доверительной вероятностью 95%)	(с доверительной вероятностью 95%)
Отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (всего 1210)	402	ВПЧ 16 типа	100% (95% ДИ: 99,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,6-100%)
	50	ВПЧ 18 типа	100% (95% ДИ: 94,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	27	ВПЧ 45 типа	100% (95% ДИ: 89,5-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	39	ВПЧ 31 типа	100% (95% ДИ: 92,6-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	31	ВПЧ 33 типа	100% (95% ДИ: 90,8-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	24	ВПЧ 35 типа	100% (95% ДИ: 88,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	61	ВПЧ 52 типа	100% (95% ДИ: 95,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	31	ВПЧ 58 типа	100% (95% ДИ: 90,8-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	43	ВПЧ 51 типа	100% (95% ДИ: 93,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	22	ВПЧ 39 типа	100% (95% ДИ: 87,3-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	19	ВПЧ 59 типа	100% (95% ДИ: 85,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	23	ВПЧ 56 типа	100% (95% ДИ: 87,8-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	7	ВПЧ 26 типа*	100% (95% ДИ: 65,2-100%)	100% (95% ДИ: 99,8-100%)
	84	ВПЧ 66 типа	100% (95% ДИ: 96,5-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	21	ВПЧ 68 типа	100% (95% ДИ: 86,7-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	44	ВПЧ 53 типа	100% (95% ДИ: 93,4-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	16	ВПЧ 73 типа	100% (95% ДИ: 82,9-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	15	ВПЧ 82 типа	100% (95% ДИ: 81,9-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	16	ВПЧ 30 типа	100% (95% ДИ: 82,9-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	17	ВПЧ 70 типа	100% (95% ДИ: 83,8-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	20	ВПЧ 67 типа	100% (95% ДИ: 86,1-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)
	16	ВПЧ 6 типа	100% (95% ДИ: 82,9-100%)	100% (95% ДИ: 99,7-100%)

3	ВПЧ 11 типа*	100% (95% ДИ: 36,8-100%)	100% (95% ДИ: 99,8-100%)
8	ВПЧ 44 типа*	100% (95% ДИ: 68,8-100%)	100% (95% ДИ: 99,8-100%)

* - Представленная выборка положительных образцов недостаточна для подтверждения высокой диагностической чувствительности исследуемого набора реагентов, однако, ввиду редкой встречаемости образцов отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта, положительных на ДНК ВПЧ типов 11, 44 и 26, исследование более широкой выборки на данном этапе не представляется возможным.

6.2. Корреляция результатов

Проведенный анализ полученных в клинических испытаниях данных выявил высокую степень корреляции результатов измерения концентрации ДНК ВПЧ типов 16, 31, 33, 35, 52, 58, 18, 45, 39, 59, 51, 56, 66, 68, 26, 53, 73, 82, 30, 70, 67, 6, 11, 44, полученных с помощью набора реагентов «HPV квант-21», цифровой капельной ПЦР и КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП.

Разница между значениями не превышала 0,5 lg в 95,8% случаев для ВПЧ 16 типа, 88,9% для ВПЧ 18 типа, 95,8% для ВПЧ 45 типа, 94,4% для ВПЧ 31 типа, 96,4% для ВПЧ 33 типа, 95,2% для ВПЧ 35 типа, 94,2% для ВПЧ 52 типа, 96,3% для ВПЧ 58 типа, 94,7% для ВПЧ 51 типа, 100,0% для ВПЧ 39 типа, 94,4% для ВПЧ 59 типа, 95,5% для ВПЧ 56 типа, 100,0% для ВПЧ 26 типа, 95,5% для ВПЧ 66 типа, 93,3% для ВПЧ 68 типа, 92,7% для ВПЧ 53 типа, 93,8% для ВПЧ 73 типа, 93,3% для ВПЧ 82 типа, 100,0% для ВПЧ 30 типа, 100,0% для ВПЧ 70 типа, 95,0% для ВПЧ 67 типа, 92,3% для ВПЧ 6 типа, 100,0% для ВПЧ 11 типа, 87,5% для ВПЧ 44 типа.

Превышение разницы значения 0,5 lg отмечалось в 4,2% случаев для ВПЧ 16 типа, 11,1% для ВПЧ 18 типа, 4,2% для ВПЧ 45 типа, 5,6% для ВПЧ 31 типа, 3,6% для ВПЧ 33 типа, 4,8% для ВПЧ 35 типа, 5,8% для ВПЧ 52 типа, 3,7% для ВПЧ 58 типа, 5,3% для ВПЧ 51 типа, 5,6% для ВПЧ 59 типа, 4,5% для ВПЧ 56 типа, 4,5% для ВПЧ 66 типа, 6,7% для ВПЧ 68 типа, 7,3% для ВПЧ 53 типа, 6,2% для ВПЧ 73 типа, 6,7% для ВПЧ 82 типа, 5,0% для ВПЧ 67 типа, 7,7% для ВПЧ 6 типа, 12,5% для ВПЧ 44 типа. Разница между результатами не превышала 1,1 lg.

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2Б.

7.1. Требования безопасности при работе с набором

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» 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».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшим подготовку

на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

7.2. Требования охраны окружающей среды

7.2.1. Набор реагентов не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности. В том числе в случае отклонений в функционировании медицинского изделия, включая определяемые по внешним признакам.

7.2.2. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности при воздействии таких предсказуемых факторов, как внешние электромагнитные поля, электростатические разряды, излучение (электромагнитное, ионизирующее, иное), атмосферное давление и его перепады, влажность и температура воздуха.

7.2.3. Набор реагентов не требует специальных мер безопасности относительно риска электромагнитных помех, поскольку в состав набора не входят и в результате применения не появляются какие-либо источники излучения.

7.2.4. Все компоненты набора нетоксичны для человека в используемых концентрациях. Реагенты, входящие в состав набора, безопасны для окружающей среды, не содержат цианид и азид натрия, а также другие вредные вещества.

7.2.5. Набор реагентов не содержит: лекарственных средств для медицинского применения, материалов животного и (или) человеческого происхождения, материалов, которые являются канцерогенными, мутагенными или токсичными, возможное выделение или вымывание которых приводит к сенсибилизации, аллергической реакции или отрицательно влияет на репродуктивную функцию.

8. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

- комплект реагентов для проведения ПЦР;
- ПЦР-бокс с УФ-лампой;
- термостат программируемый (амплификатор) или анализатор для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени;
- пипетки-дозаторы переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5 – 10; 5 - 50 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром (аэрозольным барьером) до 10 и 100 мкл;
- холодильник для хранения исходных реагентов;
- перчатки резиновые или пластиковые одноразовые.

9. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ И ПРОБОПОДГОТОВКА

9.1. Материал для исследования.

Материалом для исследования набором реагентов **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП** являются образцы ДНК, выделенные из клинических проб (отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта).

9.2. Взятие, доставка и хранение клинических образцов

Взятие материала осуществляется одноразовым стерильным зондом.

За 10 дней до взятия материала на исследование необходимо прекратить прием химиопрепаратов и лечебные процедуры. Присутствие в исследуемом материале большого количества слизи и примеси крови могут привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам.

Особенности взятия материала из уретры.

- перед взятием материала пациенту рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5 – 2 часов;
- непосредственно перед взятием материала наружное отверстие уретры необходимо обработать тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором;

- при наличии гнойных выделений соскоб рекомендуется брать через 15-20 минут после мочеиспускания, при отсутствии выделений необходимо провести массаж уретры с помощью зонда для взятия материала;

- у женщин перед введением зонда в уретру проводится ее массаж о лобковое сочленение;
- в уретру у женщины зонд вводится на глубину 1,0 – 1,5 см, у мужчин – на 3 – 4 см и затем совершается несколько вращательных движений; у детей материал для исследования берут только с наружного отверстия уретры.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладоэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

Особенности взятия материала из цервикального канала.

- перед взятием материала необходимо удалить ватным тампоном слизь и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором;
- зонд вводится в цервикальный канал на глубину 0,5 – 1,5 см;
- при наличии эрозий цервикального канала необходимо их обработать стерильным физиологическим раствором, и материал следует брать на границе здоровой и измененной ткани;
- при извлечении зонда необходимо полностью исключить его касание со стенками влагалища.

После взятия материала зонд опускается в пробирку с транспортной средой согласно инструкции производителя. Если транспортная среда не предусмотрена, то взятие материала производят в 1 мл стерильного физиологического раствора, помещенного в полипропиленовую пробирку емкостью 1,5 мл с защелкивающейся крышкой. После внесения зонда он несколько раз ротируется, а затем удаляется из пробирки. Пробирка закрывается и маркируется. Транспортировка клинического материала должна производиться только в сумке-холодильнике с хладоэлементами в течение суток, заморозка клинического материала недопустима.

9.3. Предварительная обработка клинического материала

Обработка клинического материала для выделения ДНК, а также его хранение производится согласно инструкции производителя набора для выделения ДНК из клинического материала.

Для подготовки образцов ДНК производитель набора **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП** рекомендует использовать Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала **НК-сорбент** для диагностики *in vitro* (ООО НПФ «Литех», РЗН 2019/9331).

9.4. Интерферирующие вещества и ограничения, связанные с пробой

Материалом для исследования набором реагентов **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП** являются образцы ДНК, выделенные из клинических проб.

Анализ рисков показал, что возможными ошибками применения набора реагентов **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП** могут являться:

- использование непредусмотренных для данного изделия видов анализируемого биологического материала или наборов для пробоподготовки (выделение ДНК);
- использование для проведения ПЦР-исследования образцов ДНК, содержащих избыточное количество НК, в первую очередь, геномной ДНК человека в концентрации более 100 мкг/мл.
- эндогенные интерферирующие вещества, входящие в состав клинического материала (например, избыточное количество примесей в виде слизи, крови, гноя в образцах отделяемого слизистых оболочек), приводящие к получению недостаточно очищенного препарата ДНК в результате неэффективной экстракции наборами для пробоподготовки; такие образцы должны быть отбракованы на преаналитическом этапе анализа и не подвергаться дальнейшему исследованию;
- экзогенные интерферирующие вещества (например, избыточное количество примесей в виде жиров в составе лекарственных препаратов местного действия - мазей, вагинальных свечей).

При использовании зарегистрированного в установленном порядке набора реагентов для выделения ДНК «НК-сорбент» (РУ № РЗН 2019/9331) интерференции не ожидается.

Производителем Набора реагентов НК-сорбент было показано сохранение эффективности выделения НК из клеток в случае присутствия в клинических образцах потенциально интерферирующих веществ в концентрациях, соответствующих верхней границе физиологической нормы, и превышающих их в несколько раз.

Таблица 3

образец	интерферент	допустимое содержание в образце
отделяемое слизистых оболочек уrogenитального тракта	кровь	10%
	слизь	20%
	гной	25%
	жиры	30%

Для контроля качества тестируемой ДНК и присутствия возможных ингибиторов в наборе реагентов КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП предусмотрено тестирование внутреннего контрольного образца (ВКО) с помощью специальных праймеров, входящих в состав реакционной смеси (см. п. 4.1 Инструкции). По окончании реакции амплификации наличие сигнала по каналу HEX (сигнал выявления внутреннего контроля), свидетельствует о качестве тестируемого образца нуклеиновых кислот. Сигнал выявления внутреннего контроля не должен превышать конечный цикл, указанный в инструкции к ПЦР-набору. Отсутствие или снижение эффективности сигнала ВКО после проведения ПЦР свидетельствует о ненадлежащем качестве образца для исследования и требует повторной пробоподготовки

10. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА¹

10.1. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения ВПЧ ГЕНОТИП-8 TwoStep-PB.

10.1.1. Достать набор из холодильника и подготовить необходимое количество пробирок с реакционной смесью, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

Для исследования одного образца ДНК требуется один стрип (восемь пробирок А-Н в каждом штативе). В каждой пробирке представлена реакционная смесь для определения соответствующих генотипов ВПЧ.

Расположение реакционных смесей представлено на Рис. 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Реакционная смесь 16+18+45											
B	Реакционная смесь 31+33+35											
C	Реакционная смесь 52+58+51											
D	Реакционная смесь 39+59+56											
E	Реакционная смесь 26+66+68											
F	Реакционная смесь 53+73+82											
G	Реакционная смесь 30+70+67											
H	Реакционная смесь 6+11+44											

10.1.2. Пробирку с Раствором Таq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

10.1.3. Добавить во все пробирки по 7 мкл Раствора Таq-полимеразы.

¹ Полная инструкция по применению представлена на сайте производителя www.lytech.ru, на бумажном носителе предоставляется по запросу пользователя.

- 10.1.4. В 8 пробирок стрипа с различными реакционными смесями добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами ДНК образцы в объеме 7 мкл:
- а) в 8 пробирок стрипа для отрицательного контрольного образца – разбавитель;
 - б) в 8 пробирок стрипа для исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
 - в) в 8 пробирок стрипа для положительного контрольного образца – ПКО ВПЧ ГЕНОТИП.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

Перейти к пункту 10.3.

10.2. Подготовка к проведению амплификации, вариант исполнения ВПЧ ГЕНОТИП-4 TwoStep-PB.

10.2.1. Достать набор из холодильника и подготовить необходимое количество пробирок с реакционной смесью, включая пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

Для исследования одного образца ДНК требуется половина стрипа (четыре пробирки А-Д или Е-Н). В каждой пробирке представлена реакционная смесь для определения соответствующих генотипов ВПЧ.

10.2.2. Пробирку с Раствором Таq-полимеразы перемешать пипетированием или импульсным вортексированием в течение 10 секунд.

10.2.3. Добавить во все пробирки по 7 мкл Раствора Таq-полимеразы.

10.2.4. В 4 пробирки с различными реакционными смесями добавить индивидуальными наконечниками с аэрозольными фильтрами образцы в объеме 7 мкл:

- а) в 4 пробирки для отрицательного контрольного образца – разбавитель;
- б) в 4 пробирки для исследуемых образцов – исследуемые образцы ДНК;
- в) в 4 пробирки для положительного контрольного образца – ПКО ВПЧ ГЕНОТИП.

Для снижения риска контаминации образцы следует добавлять в указанном порядке. Пробирку, в которую был внесен образец, следует, по возможности, немедленно закрывать крышкой.

Расположение реакционных смесей представлено на Рис. 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Реакционная смесь 16+18+45											
B	Реакционная смесь 31+33+35											
C	Реакционная смесь 52+58+51											
D	Реакционная смесь 39+59+56											
E	Реакционная смесь 16+18+45											
F	Реакционная смесь 31+33+35											
G	Реакционная смесь 52+58+51											
H	Реакционная смесь 39+59+56											

10.3. Проведение амплификации, все варианты исполнения.

10.3.1. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

10.3.2. Перенести пробирки в амплификатор с детекцией результатов «в режиме реального времени» и провести амплификацию по следующей программе (ниже представлены программы амплификации для различных видов амплификаторов):

«CFX 96» (BioRad)
«Rotor-Gene Q» (QIAGEN)

+80 °C	2 мин	
+95 °C	1 мин 30 сек	
+95 °C	15 сек	40 циклов
+60 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5)	
+72 °C	40 сек	

«iCycler IQ5» (BioRad)
ДТ-96 (ДНК-Технология)

+80 °C	2 мин	
+94 °C	1 мин 30 сек	
+94 °C	10 сек	40 циклов
+62 °C	30 сек (считывание по каналам FAM, HEX, ROX, Cy5)	
+72 °C	20 сек	

Примечание. Подробное руководство для работы на амплификаторах с детекцией результата «в режиме реального времени» представлено в специально разработанных ПРИЛОЖЕНИЯХ для конкретного вида прибора (www.lytech.ru).

11. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Детекция результатов

Детекция продуктов амплификации «в реальном времени» осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

При проведении ПЦР с детекцией результатов «в режиме реального времени» измерения проводятся в каждом цикле амплификации.

Настройки для анализа результатов, полученных с помощью набора реагентов КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП, представлены в таблице 4 на примере амплификатора с детекцией в режиме «реального времени» ДТ-96 (ДНК-технология, Россия).

Таблица 4.

Параметр	Канал флуоресценции			
	FAM	HEX	ROX	Cy5
Baseline threshold	60	20	20	20
Конечный цикл	36	30	36	36

С использованием этих настроек анализирующая программа автоматически рассчитает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией. Отсутствие значения для образца (значение N/A) означает, что пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией не было. Все имеющиеся значения сравниваются с соответствующим значением конечного цикла (КЦ). Ситуация, когда значение больше конечного цикла, равносильна отсутствию значения.

Анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией по применению программного обеспечения прибора.

11.2. Интерпретация результатов

Мишени, детектируемые по используемым каналам флуоресценции, представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Вариант исполнения		Реакционная смесь	Канал флуоресценции и детектируемая мишень			
			FAM генотип ВПЧ	ROX генотип ВПЧ	Cy5 генотип ВПЧ	HEX Внутренний контроль
ВПЧ ГЕНОТИП-4 TwoStep-PB ВПЧ ГЕНОТИП-8 TwoStep-PB		16+18+45	16	18	45	ген b-глобина человека
		31+33+35	31	33	35	ген b-глобина человека
		52+58+51	52	58	51	ген b-глобина человека
		39+59+56	39	59	56	ген b-глобина человека
		26+66+68	26	66	68	ген b-глобина человека
		53+73+82	53	73	82	ген b-глобина человека
		30+70+67	30	70	67	ген b-глобина человека
		6+11+44	6	11	44	ген b-глобина человека

Интерпретация результатов анализа с целью выявления и идентификации ДНК ВПЧ проводится в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6.

Образец	Значения Ct		Результат
	Каналы FAM, ROX, Cy5	Канал HEX	
ПКО ВПЧ ГЕНОТИП	20 – 28*		Реакция прошла
	Не соответствует вкладышу		Реакция не прошла. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
Отрицательный контрольный образец	НЗ или > КЦ	любой	Специфическая контаминация отсутствует.
	< КЦ по любому из каналов	любой	Специфическая контаминация. ТРЕБУЕТСЯ повтор постановки.
	НЗ или > КЦ	< КЦ	Контаминация геномной ДНК человека. Повтор постановки НЕ ТРЕБУЕТСЯ .
Исследуемый образец	< КЦ	< КЦ	ПРИСУТСТВИЕ ДНК ВПЧ соответствующего типа
	НЗ или > КЦ	< КЦ	ОТСУТСТВИЕ ДНК ВПЧ соответствующего типа.
	любой	НЗ или > КЦ	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

* точный диапазон значений указан во вкладыше к набору реагентов.

11.3. Расчет концентрации ДНК в анализируемом образце

Рассчитать концентрацию ДНК ВПЧ и – при необходимости – ДНК человека* в образце по формуле:

$$C_{\text{образца}} = C_{\text{КО}} * 2^{(Ct_{\text{КО}} - Ct_{\text{образца}})}$$

*Концентрация ДНК человека в образце вычисляется для каждой реакционной смеси индивидуально.

$C_{\text{образца}}$ – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце, выраженная в

геном-эквивалентах/мл;

Ско – концентрация соответствующего калибратора в ПКО ВПЧ ГЕНОТИП, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору);

$Ct_{\text{образца}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией;

$Ct_{\text{КО}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции соответствующего калибратора в составе ПКО ВПЧ ГЕНОТИП с пороговой линией.

Интерпретация результата проводится согласно таблице 7.

Таблица 7.

Концентрация ДНК ВПЧ	Концентрация ДНК человека	Интерпретация
Определена, от 2×10^7 до 2×10^3 ГЭ/мл	$> 1 \times 10^5$ ГЭ/мл	ДНК ВПЧ ОБНАРУЖЕНА, возможно точное указание концентрации
Определена, менее 2×10^3 ГЭ/мл		ДНК ВПЧ ОБНАРУЖЕНА, концентрация менее 2×10^3 ГЭ/мл
Определена, более 2×10^7 ГЭ/мл		ДНК ВПЧ ОБНАРУЖЕНА, концентрация более 2×10^7 ГЭ/мл
Не определена	$> 1 \times 10^5$ ГЭ/мл	ДНК ВПЧ не обнаружена.
Любая	НЗ или $< 1 \times 10^5$ ГЭ/мл	Ингибирование или недостаточное выделение ДНК. ТРЕБУЕТСЯ повтор анализа данного образца.

Концентрация ДНК ВПЧ может также нормироваться на количество ДНК человека, присутствующее в образце, таким образом вводится поправка на погрешности, связанные с забором материала. Используется значение концентрации ДНК человека, вычисленное для соответствующей реакционной смеси!

При этом концентрация ВПЧ из расчёта на 10^5 клеток человека вычисляется по формуле:

$$\frac{C_{\text{ГЭ/мл ДНК ВПЧ}}}{C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}} * 100000,$$

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК ВПЧ}}$ - вычисленная концентрация ДНК ВПЧ в образце

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}$ - вычисленная концентрация ДНК человека в образце для соответствующей реакционной смеси.

Концентрация ДНК ВПЧ из расчета на 10^5 клеток человека может быть также представлена в виде десятичного логарифма:

$$\lg \left(\frac{C_{\text{ГЭ ДНК ВПЧ}}}{C_{\text{ГЭ ДНК человека}}} * 100000 \right),$$

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК ВПЧ}}$ - вычисленная концентрация ДНК ВПЧ в образце

$C_{\text{ГЭ/мл ДНК человека}}$ - вычисленная концентрация ДНК человека в образце для соответствующей реакционной смеси.

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

12.1. Условия хранения

Набор КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП во всех вариантах исполнения должен храниться при температуре $+2...+8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности. Срок годности набора – 9 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетках для невскрытых реагентов.

12.2. Транспортирование

Набор реагентов КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП транспортируют всеми видами транспорта (в закрытых железнодорожных вагонах, в отапливаемых герметичных отсеках самолетов и

автомобильным транспортом, (условия транспортирования соответствуют условиям хранения) по правилам перевозок грузов соответствующих транспортных ведомств. Допустима транспортировка при температуре от +18 ... +25 °С в течение 3 дней (не более). Изделия, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

13. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАБОРА

Предприятие-изготовитель проводит приемочные испытания для каждой производственной серии, осуществляя верификационный контроль основных аналитических характеристик (технические характеристики), внешний вид, комплектность, упаковку, маркировку, а также контроль качества сырья и компонентов.

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 контроля качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК выявляемых микроорганизмов (например, панели ФСВОК).

14. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

Уничтожение отходов, использованных и неиспользованных компонентов набора, наборов реагентов с истекшим сроком годности проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожают разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Отходы биоматериала (инфицированные и потенциально инфицированные отходы) из клинично-диагностических лабораторий, работающих с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, образцы материала после пробоподготовки (выделение ДНК) и отходы после проведения амплификации относятся к классу Б (эпидемически опасные отходы).

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

15. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам, касающимся качества набора **КОМПЛЕКС ВПЧ ГЕНОТИП**, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1, стр.3, телефон/факс: (495)258-39-47, или e-mail: info@lytech.ru

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»



П.К. Варнавичус



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 14 ЛИСТОВ

« 08 » 10 2020 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Барнавичус П.К.

Прошито, проверено,
скреплено печатью.

Количество листов
шт.

Наумов А.Ю.

