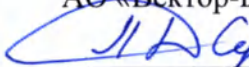


«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«10» октября 2024 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК вируса папилломы человека 44 типа
методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени
«РеалБест ДНК ВПЧ 44»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК вируса папилломы человека 44 типа методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени «РеалБест ДНК ВПЧ 44» предназначен для качественного выявления ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) 44 типа в клинических образцах (соскобы эпителиальных клеток) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридным 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 гибридного ДНК-зонда, специфичного для выбранного участка ДНК возбудителя инфекции, 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

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

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.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением целевой ДНК из клинического материала совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

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

В комплект поставки входят:

- набор реагентов;
- инструкция по применению и паспорт (количество копий определяется в договоре на поставку продукции).

Инструкция по применению и паспорт размещены на сайте (<http://www.vector-best.ru>).

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 Уни-Маг» и «Лизирующий раствор» производства АО «Вектор-Бест».

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа: «CFX96», (фирма «Bio-Rad», США); «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

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

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность:

Чувствительность выявления ДНК ВПЧ 44 типа – не более 100 копий в пробе; определяется по стандартному образцу предприятия (СОП 05-2-473), образцы с содержанием ДНК ВПЧ 44 типа 100 копий в пробе в 100 % случаев дают положительный результат.

3.2. Аналитическая специфичность:

Для оценки аналитической специфичности были проведены проверки с ДНК бактерий, грибов и вирусов, которые могут присутствовать в урогенитальных соскобах эпителиальных клеток: ВПЧ 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 типов; *Candida albicans*.

Neisseria gonorrhoeae, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma species*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, ЦМВ, ВЭБ, ВПГ-1, ВПГ-2. Перекрестно реагирующих ДНК бактерий, грибов и вирусов по данным, полученным при исследованиях в рамках клинико-лабораторных испытаний, обнаружено не было.

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.

3.3. Диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 44 типа: клинические испытания, проведенные на 44 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 44 типа, показали 100 % чувствительность (интервал 92,0 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %);

3.4. Диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 44 типа: клинические испытания, проведенные на 96 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 44 типа, показали 100 % специфичность (интервал 96,2 % - 100 %, с доверительной вероятностью 95 %).

3.5. Воспроизводимость результатов качественного дифференциального выявления ДНК ВПЧ 44 типа: клинические испытания, проведенные на 140 образцах, содержащих и не содержащих ДНК ВПЧ 44 типа, с использованием двух серий набора реагентов, показали 100 % межсерийную воспроизводимость результатов. При тестировании в двух независимых постановках двумя разными операторами образцов с разной вирусной нагрузкой в 8 повторах каждый внутрипостановочная и межпостановочная воспроизводимость результатов составила 100 %. Коэффициент вариации *St* не более 2 %.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Лаборатории, выполняющие исследования по выявлению ДНК ВПЧ 44, 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 (например, врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник (фельдшер-лаборант), иной специалист).

- 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», 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 и Б, 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» и «FAM»):
«CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, ЗАО «Ламинарные системы», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- встряхиватель для пробирок (например, Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);

- мини-шейкер, обеспечивающий частоту вращения 1200-1800 об/мин (например, «PSU-2T», 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».

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 клинико-диагностических лабораторий «Преаналитический этап лабораторных исследований» Министерства образования и науки (сост.: Кочетов А.Г. с соавт - Москва: РУДН, 2012. – 251 с.).

Для анализа используется ДНК, выделенная 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» согласно инструкции по применению соответствующего набора.

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) °C 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.

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) °C не более 3 месяцев.

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

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

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок. Оптическая плёнка должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя для каждого образца индивидуальный накопчик с фильтром, внести по 50 мкл раствора выделенной ДНК. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

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.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов ДНК ВКО и ДНК ВПЧ 44 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.

7.5. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК ВПЧ 44:

«FAM» – для регистрации сигнала ДНК ВКО;

«ROX» – для регистрации сигнала ДНК ВПЧ 44.

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

7.7. Запустить программу и провести реакцию амплификации с регистрацией флуоресценции в режиме реального времени.

8. АНАЛИЗ И УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Условия анализа и учёта результатов.

8.1.1. В ПКО программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять значение порогового цикла C_t ВКО;
- нарастание сигнала амплификации ДНК ВПЧ 44 (канал «ROX») и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

8.1.2. В ОКО программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM») и определять C_t ВКО, при этом по каналу «ROX» программа не должна регистрировать нарастание сигнала специфического продукта амплификации ДНК с C_t меньше или равно 40.

Если для ОКО значение C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40, 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 (канал «FAM») и определять C_t ВКО.

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). 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 44), если для этого образца C_t по каналу «ROX» больше 40 или не определяется.

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 44), если для этого образца значения C_t по каналу «ROX» меньше или равно 40.

8.2.4. В случае контаминации все положительные результаты по данной индивидуальной постановке ПЦР считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать, как отрицательные.

9. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных 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 холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией 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 инструкции 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, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, 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.

Инструкция по применению и паспорт размещены на сайте <http://www.vector-best.ru>.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест ДНК ВПЧ 44», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

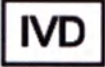
630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,

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.

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

Символ	Описание	Символ	Описание
	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Содержимого достаточно для проведения < n > тестов		Температурный диапазон
	Код партии		Дата изготовления
	Изготовитель		Обратитесь к инструкции по применению или инструкции по применению в электронном виде
	Использовать до	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате: Год-Месяц-День Год-Месяц

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



А.В. Трухина

Директор по производству
АО «Вектор-Бест»



В.К. Ткачев

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 9 листов.

Директор по технологии и качеству
АО «Вектор-Бест»



11 Масяго А.В.
«11» 11 20 24 г.