

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления ДНК вирусов папилломы человека

16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типов высокого канцерогенного риска

методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

(РеалБест ДНК ВПЧ ВКР скрин

(комплект 1))

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК ВПЧ ВКР скрин» предназначен для выявления (без определения генотипа) ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типов высокого канцерогенного риска (ВКР) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинических проб проводится с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3» и «РеалБест экстракция 100».

Комплект 1 предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами планшетного типа «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Комплект 1 рассчитан на проведение анализа 96 образцов, включая контрольные образцы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного фрагмента ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах: температурная денатурация, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями, достройка полинуклеотидных последовательностей 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 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-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 ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым **внутренним контрольным образцом (ВКО)**.

При анализе содержания ДНК ВПЧ ВКР для каждого образца используется две пробирки (ГРС-1

и ГРС-2).

2.2. Состав набора:

- положительный контрольный образец (ПКО) – на основе плазмидной ДНК со встройкой фрагментов ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типов высокого канцерогенного риска – 2 пробирки по 1 мл;
- готовая реакционная смесь для ПЦР № 1 (ГРС-1), лиофилизированная – 96 пробирок.
- готовая реакционная смесь для ПЦР № 2 (ГРС-2), лиофилизированная – 96 пробирок.

Набор дополнительно комплектуется:

- оптической плёнкой – 3 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. **Чувствительность** выявления ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типов (по четырём образцам, содержащим 100 копий ДНК, приготовленным из стандартных образцов предприятия) – 100%.

3.2. **Специфичность** выявления ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типов (по стандартной панели предприятия отрицательных ДНК-экстрактов (СПП ВПЧ)) – 100%.

3.3. **Диагностическая чувствительность** выявления ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска: клинические испытания, проведённые на 95 положительных образцах, показали 100% чувствительность (интервал 97%–100%, с доверительной вероятностью 90%);

3.4. **Диагностическая специфичность** выявления ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска: клинические испытания, проведённые на 54 отрицательных образцах, показали 100% специфичность (интервал 95%–100%, с доверительной вероятностью 90%).

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

ВНИМАНИЕ! Несоблюдение приведённых ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.

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

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. 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».

4.4. При работе с набором следует надевать **одноразовые** медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объёма, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать **только одноразовые** наконечники с фильтром для пипеток.

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

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДПП-2Т»; 1–3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5–1% раствор «Мистраль»; 0,5–2% раствор «Велтолен»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

4.10. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпиде-

миологические требования к обращению с медицинскими отходами». Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени: «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма «Bio-Rad», США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;
- ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, «ЦиклоТемп» фирмы СП «РТС», Россия);
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма «Лентипет», Россия; фирма «Biohit», Финляндия);
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия);
- одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip, Финляндия);
- штативы для микропробирок вместимостью 0,2 мл (фирма «Хеликон», Россия);
- контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ», или аналогичный);
- нож канцелярский.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью наборов: «РеалБест ДНК-экспресс», «РеалБест ДНК-экстракция 1», «РеалБест ДНК-экстракция 2», «РеалБест ДНК-экстракция 3», «РеалБест экстракция 100» согласно инструкциям по применению соответствующих наборов.

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

Если до проведения анализа образцы выделенной ДНК хранились в замороженном виде, разморозить их и выдержать при температуре от (18–25) °С не менее 30 минут.

Выделенную ДНК хранить при температуре (2–8) °С не более 2 суток.

ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2–8) °С в течение 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при минус (18–24) °С до 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка компонентов набора.

Перед началом работы извлечь набор из холодильника, выдержать ГРС-1 и ГРС-2 в упаковке (*не вскрывая!*) при температуре (18–25) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно, с помощью канцелярского ножа отрезать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС-1 и столько же пробирок с ГРС-2. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

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

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС составляет при температуре хранения (2–8) °С 3 месяца.

7.2. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС-1 пронумеровать и расположить в штативе.

7.3. Необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы) пробирок с ГРС-2 пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! Надписи следует располагать на боковой части пробирок.

7.4. В каждую пробирку с ГРС-1 и ГРС-2 пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести **50 мкл** соответствующего **раствора выделенной ДНК**. Не захватывать осадок!

Плотно заклеить пробирки оптической плёнкой.

7.5. Поместить пробирки в амплификатор.

7.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов **ДНК ВПЧ ВКР, ДНК ВКО** и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.7. Запрограммировать 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.

7.8. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК.

Для ГРС-1:

– для регистрации сигнала при амплификации **ДНК ВКО** в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM»;

– для регистрации сигнала при амплификации **ДНК ВПЧ ВКР** в системе применены гибридационные ДНК-зонды, меченные флуорофорами HEX, ROX. Для детекции следует выбирать каналы детекции «HEX», «ROX».

Для ГРС-2:

– для регистрации сигнала при амплификации **ДНК ВКО** в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором FAM. Для детекции следует выбирать канал детекции «FAM»;

– для регистрации сигнала при амплификации **ДНК ВПЧ ВКР** в системе применён гибридационный ДНК-зонд, меченный флуорофором ROX. Для детекции следует выбирать канал детекции «ROX».

7.8. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, ПКО и ОКО согласно инструкции к используемому прибору.

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

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. В **ПКО** в **ГРС-1** программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** (канал «FAM») и определять значение порогового цикла **Ct ВКО**;

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

8.2. Для **ПКО** в **ГРС-2** программа должна фиксировать:

– нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** (канал «FAM») и определять значение порогового цикла **Ct ВКО**;

– нарастание сигнала амплификации **ДНК ВПЧ ВКР** (канал «ROX») и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**.

8.3. Для **ОКО** в **ГРС-1** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** (канал «FAM») и определять **Ct ВКО**, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналам «HEX» и «ROX».

Для **ОКО** в **ГРС-2** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** (канал «FAM») и определять **Ct ВКО**, при этом программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК по каналу «ROX».

8.4. В **каждом исследуемом образце** в **ГРС-1** и в **ГРС-2** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации **ДНК ВКО** (канал «FAM») и определять **Ct ВКО**.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Анализ результатов выявления ДНК ВПЧ ВКР.

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

9.1.2. Анализируемый образец считается **положительным**, т.е. содержащим ДНК ВПЧ ВКР, если для этого образца значение Ct в каком-либо из каналов «HEX» или «ROX» в ГРС-1 или по каналу «ROX» в ГРС-2 **меньше или равно 40**.

9.1.3. Анализируемый образец считается **отрицательным**, т.е. не содержащим ДНК ВПЧ ВКР, если для этого образца значение Ct по каналам «HEX», «ROX» в ГРС-1 и по каналу «ROX» в ГРС-2 **больше 40 или не определяется**.

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

9.2. Если для ОКО значение Ct по каналам «HEX» или «ROX» в ГРС-1 **меньше или равно 40** или значение Ct по каналу «ROX» в ГРС-2 **меньше или равно 40**, то это свидетельствует о наличии контаминации. В этом случае положительные результаты, полученные в 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, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. 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 25 °С не более 10 суток.

10.2. 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.

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

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

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

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счёт 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, следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:
630117, г. Новосибирск-117, а/я 492,
тел.: (383) 332-92-49, 227-60-30;
тел./факс: (383) 332-94-47, 332-94-44;
E-mail: plkobtk@vector-best.ru.

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

	Номер по каталогу		Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов		Не стерильно
	Код партии		Температурный диапазон
	Дата изготовления: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Изготовитель
	Использовать до: XXXX-XX-XX Формат даты: год-месяц-число		Обратитесь к Инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению		

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 334-35-90.