«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«13» _____ 2022 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы человека
16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции
в режиме реального времени
(РеалБест ДНК ВПЧ 16/18
(комплект 1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы человека 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени **«РеалБест ДНК ВПЧ 16/18»** предназначен для дифференциального выявления ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК из клинического материала проводится с помощью наборов **«РеалБест ДНК-экспресс»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 1»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 2»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 3»** или **«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.

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-полимеразой. В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. Увеличение сигналов флуоресценции происходит благодаря использованию гибридизационного 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

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

инфекции из клинического материала совместно с предварительно внесённым **внутренним контрольным образцом (ВКО)**.

2.2. Состав набора:

положительный контрольный образец универсальный (ПКО) – 1 пробирка, 1 мл;
готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 96 пробирок.

Принадлежности:

- оптическая плёнка – 1,5 листа.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. **Чувствительность** выявления **ДНК ВПЧ 16** определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК ВПЧ 16 *(СОП 05-2-355)*, с содержанием ДНК ВПЧ 16 типа 100 копий в пробе – 100%.

Чувствительность выявления **ДНК ВПЧ 18** определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК ВПЧ 18 *(СОП 05-2-355)*, с содержанием ДНК ВПЧ 18 типа 100 копий в пробе – 100%.

3.2. **Специфичность** выявления **ДНК ВПЧ 16** определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК ВПЧ 18 *(СОП 05-2-355)*, с содержанием ДНК ВПЧ 18 типа 100 копий в пробе – 100%.

Специфичность выявления **ДНК ВПЧ 18** определяется по пяти образцам, приготовленным из СОП ДНК ВПЧ 16 *(СОП 05-2-355)*, с содержанием ДНК ВПЧ 16 типа 100 копий в пробе – 100%.

3.3. **Диагностическая чувствительность** выявления ДНК вирусов папилломы человека 16 и 18 типов: клинические испытания, проведённые на 92 положительных образцах, показали 100% чувствительность *(интервал 96,8%–100%, с доверительной вероятностью 90%)*;

3.4. **Диагностическая специфичность** выявления ДНК вирусов папилломы человека 16 и 18 типов: клинические испытания, проведённые на 94 отрицательных образцах, показали 100% специфичность *(интервал 96,9%–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, исследующих 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 дозаторов 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 дозаторов.

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: 0,2% раствор «ДП-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 *(см. МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения»)*.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и 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 *(«ЦиклоТемп» СП «РТС», Россия);*
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2−8) °С;
- микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» *(фирма «Eppendorf», Германия)*;
- встряхиватель для пробирок *(Bio-Vortex V-1 plus, фирма «BioSan», Латвия);*
- дозаторы одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками *(фирма «Biohit», Финляндия);*
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые *(перчатки «NeoTouch», фирма «Ansell HealthCare», Германия)*;
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром /аэрозольным барьером *(фирма «FinnTip», Финляндия)*;
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл *(фирма «Хеликон», Россия)*;
- контейнер для сброса отходов *(«Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма «КМ-ПРОЕКТ»)*;
- нож канцелярский.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

Для анализа используются пробы выделенной ДНК, полученные из клинического материала с помощью одного из наборов: **«РеалБест ДНК-экспресс»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 1»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 2»**, **«РеалБест ДНК-экстракция 3»** или **«РеалБест экстракция 100»**, согласно инструкции по применению соответствующего набора реагентов.

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

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 (18–25) °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. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

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

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

6.2.2. ПКО после вскрытия пробирки хранить при температуре (2−8) °С не более 1 месяца или аликвотами по 50 мкл при температуре минус (18−24) °С 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*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

должна оставаться чистой!

7.2. В каждую пробирку дозатором, используя наконечник с фильтром, внести по **50 мкл раствора выделенной ДНК**. Закрыть пробирки оптической плёнкой.

7.3. Поместить пробирки в амплификатор.

7.4. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфических фрагментов **ДНК ВКО, ДНК ВПЧ 16, ДНК ВПЧ 18** и детекции сигналов флуоресценции. Программирование амплификатора проводить в соответствии с инструкцией к прибору.

7.5. Запрограммировать протокол проведения реакции амплификации:

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;
2 стадия: 95 °С – 2 минуты;
3 стадия: 50 циклов *(94 °С – 10 секунд,*
60 °С – 20 секунд);
Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

7.6. Выбрать каналы детекции результатов амплификации **ДНК ВКО, ДНК ВПЧ 16 и ДНК ВПЧ 18**:

«**FAM**» – для регистрации сигнала **ДНК ВКО;**

«HEX» – для регистрации сигнала **ДНК ВПЧ 16** типа;

«ROX» – для регистрации сигнала **ДНК ВПЧ 18 типа**.

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

7.8. 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 **Ct ВКО;**

– нарастание сигнала специфического продукта амплификации **ДНК ВПЧ 16 типа** *(канал «HEX»)* и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**;

– нарастание сигнала специфического продукта амплификации **ДНК ВПЧ 18 типа** *(канал «ROX»)* и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**;

8.1.2. В **ОКО** 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 **«HEX» и** по каналу **«ROX».**

Если для ОКО значение **Ct** по каналу **«HEX» и/или «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 **Ct** ВКО.

8.2. Учёт результатов.

8.2.1. Вычислить $(\textbf{Ct}\ \text{ВКО})_{ср}$ как среднее значение **Ct** ВКО всех анализируемых образцов *(включая ПКО и ОКО)*. Отбраковке подлежат значения **Ct** ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(\textbf{Ct}\ \text{ВКО})_{ср}$. После отбраковки пересчитать $(\textbf{Ct}\ \text{ВКО})_{ср}$ для оставшихся значений.

8.2.2. Анализируемый образец **считается отрицательным** *(не содержащим ДНК ВПЧ 16 и 18 типов)*, если для этого образца значение **Ct** по каналам **«HEX» и «ROX» больше 40 или не определяется.**

Если для такого образца значение **Ct** ВКО превышает значение $(\textbf{Ct}\ \text{ВКО})_{ср}$ 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 ДНК.

8.2.3. Анализируемый образец **считается положительным,** содержащим **ДНК ВПЧ 16** типа,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

если для этого образца значение **Ct** по каналу **«HEX» меньше или равно 40.**

Анализируемый образец **считается положительным**, содержащим **ДНК ВПЧ 18 типа**, если для этого образца значение **Ct** 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 25 °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 данной инструкции по применению набора.

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 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 **«РеалБест ДНК ВПЧ 16/18»**, следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:*
630117, г. Новосибирск, 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

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ:

ПРИЛОЖЕНИЕ

Проведение анализа на приборе
«ДТ-96» (*НПО «ДНК-Технология»*)

1. <u>Настройка экспозиции измерений:</u>

В режиме **«Работа с прибором»** в меню **«Настройки»** выберите пункт **«Экспозиция измерений»**.

В открывшемся окне выберите канал **«FAM»**, измените значение экспозиции на «**250**», для каналов **«HEX»** и **«ROX»** установите значение экспозиции «**1000**». Подтвердите сохранение текущего значения экспозиции, нажав «**ДА**».

<u>Внимание!</u> *Указанные значения экспозиций применимы только для наборов «**РеалБест**» и при необходимости должны быть изменены на исходные.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2. Программирование амплификатора:

2.1. Для создания протокола амплификации нажать кнопку **«Создать»** во вкладке **«Запуск программы амплификации»**.

2.2. В открывшемся окне выбрать первый шаблон программы амплификации, отредактировать его в соответствии с программой амплификации к используемому набору:

Для наборов **«РеалБест ДНК»:**

1 стадия: 50 °С – 2 минуты;

2 стадия: 95 °С – 2 минуты;

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

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

Для наборов **«РеалБест РНК»:**

1 стадия: 45 °С – 30 минут;

2 стадия: 94 °С – 1 минута;

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

Измерение флуоресценции проводить при 60 °С.

2.3. В ячейке **«Имя программы»** ввести название созданного протокола амплификации *(например, PCR и RT-PCR)* и нажать **«ОК»**. В открывшемся окне указать папку для сохранения файла и нажать **«сохранить»**.

2.4. В ячейке **«Объём рабочей смеси»** указать значение «**50**».

2.5. Во вкладке **«Протокол»** сначала ввести названия всех образцов, участвующих в постановке, затем заполнить планшет.

Для упрощения заполнения планшета можно создать заготовку, для этого в меню **«Тест»** выбрать **«Создать/редактировать тест»**, затем **«Копировать текущий тест»** с именем TEST и присвоить имя новому тесту.

В открывшемся окне в пункте **«1.Анализ»** выставить тип анализа *(количественный или качественный со стандартами в соответствии с набором)* и метод **«Геометрический (Ср)»**.

Для качественного анализа в пункте **«4.Контроли»** выставить «**1**»; для количественного анализа со стандартами *(при постановке с КО1, КО2)* в пункте **«3.Стандарты»** в ячейке **«Количество»** выставить «**2**», в ячейке **«2.Дубли»** – «**3**», в пункте **«4.Контроли»** в ячейке **«$К^+$»** выставить «**3**», в ячейке **«$К^-$ »** – «**1**».

Если постановка без КО1 и КО2, то в пункте **«3.Стандарты»** в ячейке **«Количество»** поставить «**0**».

В пункте **«5.Объём рабочей смеси в пробирке»** выставить значение «**50**».

В пункте **«6. Флуорофоры»** обозначить **внутренний контроль (ВК)** по каналу **«FAM»** и специфику по каналу **«HEX»** или **«ROX**» в соответствии с инструкцией к набору.

По завершении редактирования нажать **«ОК»**.

В дальнейшем при заполнении протокола следует использовать кнопку **«Добавить тест**», из списка выбрать нужный для данной постановки и ввести число образцов и контролей.

По окончании заполнения протокола нажать **«Применить»**.

2.6. Программа перейдет на вкладку **«Запуск программы амплификации»**, запустить амплификацию кнопкой **«Запуск программы»**. Результаты реакции сохраняются после нажатия кнопки «**Запуск программы»** в файл с расширением *.r96.

3. Анализ и учёт результатов.

Детекция флуоресценции осуществляется по каналам «**FAM»** и «**ROX»** для ДНК ВКО и ДНК возбудителя, соответственно.

Программа автоматически высчитывает пороговое значение флуоресценции по методу **Геометрический (Ср)**.

При одновременном выявлении ДНК двух возбудителей ДНК второго возбудителя детектируется по каналу «HEX».

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ГРАФИЧЕСКИЕ СИМВОЛЫ

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ n	Содержимого достаточно для проведения n количества тестов	NON STERILE	Не стерильно
LOT	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.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru