«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

_____ М.Д. Хусаинов

«01» февраля 2024г.

м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов для выявления ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
«РеалБест ВПЧ ОнкоСкрин»

ВВЕДЕНИЕ

Папилломавирусная инфекция – одна из самых распространенных инфекций, передаваемых половым путём. **Вирус папилломы человека (ВПЧ)** представляет собой небольшой ДНК-содержащий вирус, поражающий базальные клетки травмированного эпителия. К настоящему моменту известно уже более 100 типов ВПЧ, среди которых выделяют 14 клинически значимых типов **высокого канцерогенного риска (ВКР)**. В большинстве случаев заражения ВПЧ ВКР *(более 90%)* он элиминируется иммунной системой в течение нескольких лет. В оставшихся случаях в результате его длительной персистенции в базальном слое эпителия могут развиваться предраковые *(неоплазии)* поражения и рак шейки матки.

Рак шейки матки является четвертым наиболее распространённым видом рака среди женщин после рака груди, колоректального рака и рака лёгких. Около 90–95% случаев рака шейки матки вызваны ВПЧ ВКР. Повреждение эпителия прогрессирует медленно, этот процесс может занимать от 5 до 20 лет, в зависимости от состояния иммунитета женщины и влияния различных сопутствующих факторов. Неоплазия остаётся бессимптомной на протяжении долгого времени, в связи с чем необходимо проведение регулярного цервикального скрининга для выявления поражений на ранних стадиях и своевременного лечения.

С помощью математического моделирования было рассчитано, что если смертность от рака шейки матки без проведения скрининга составляет в среднем 8,3 случаев на 1000 женщин, то систематический цервикальный скрининг позволяет снизить этот показатель до 0,76, при проведении его методом цитологического исследования, до 0,29 при использовании ВПЧ-тестирования в качестве первичного анализа, и до 0,3, если проводить одновременно цитологическое исследование и ВПЧ-тестирование. Таким образом, было показано, что эффективность скрининговых программ, основанных на ВПЧ-тестировании, более чем в 2 раза выше цитологического скрининга *(Fontham ETH, Wolf AMD, Church TR, Etzioni R, Flowers CR, Herzig A, Guerra CE, Oeffinger KC, Shih YT, Walter LC, Kim JJ, Andrews KS, DeSantis CE, Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, Wender RC, Smith RA. Cervical cancer screening for individuals at average risk: 2020 guideline update from the American Cancer Society. CA Cancer J Clin. 2020 Sep; 70(5): 321-346.)*.

Согласно современным рекомендациям WHO *(World health organization – Всемирная организация здравоохранения)*, ACS *(American Cancer Society – Американское онкологическое общество)*, ASCCP *(American Society for Colposcopy and Cervical Pathology – Американское общество кольпоскопии и патологии шейки матки)* и др., проведение цервикального скрининга должно быть основано предпочтительно на выявлении ДНК или РНК ВПЧ ВКР методом амплификации нуклеиновых кислот *(Nucleic Acid Amplification Technology – NAT)*.

В соответствии с вышеупомянутыми рекомендациями, тест, предназначенный для проведения цервикального скрининга, должен позволять качественно *(выявлено/не выявлено)* определять наличие

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

основных типов ВПЧ ВКР *(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, и предпочтительно 66, 68)*. Ввиду того, что более 70% всех случаев рака и предраковых поражений шейки матки вызваны ВПЧ 16 и 18 типов и персистенция этих типов связана с более высоким риском развития патологии эпителия шейки матки, то желательно определять их наличие/отсутствие отдельно от остальных генотипов ВПЧ ВКР, которые могут определяться пулом без типирования. Для предотвращения получения ложноотрицательных результатов, связанных с недостаточным количеством клеточного материала в анализируемом образце, рекомендуется использование контроля количества ДНК человека.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для выявления ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени **«РеалБест ВПЧ ОнкоСкрин»** предназначен для качественного выявления ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска *(ВПЧ ВКР)* 14 клинически значимых типов *(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68)* с дифференциальным определением ВПЧ ВКР типов 16 и 18 в клинических образцах *(соскобах эпителиальных клеток с поверхности шейки матки и цервикального канала, включая образцы для жидкостной цитологии)* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Набор может быть использован для выявления папилломавирусной инфекции в рамках программ по цервикальному скринингу.

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 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 ДНК-полимеразы, зонд расщепляется с 5'-конца и происходит разобщение красителя и гасителя, приводящее по мере накопления продукта реакции к возрастанию сигнала флуоресценции. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством целевой ДНК в образце.

Дифференциальное выявление ВПЧ 16, ВПЧ 18 и остальных 12 типов ВПЧ ВКР (*31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68)* обеспечено независимой детекцией фрагментов их геномов, за счёт флуорогенных специфичных зондов, детектируемых в разных каналах.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением целевой ДНК из клинического материала 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)*.

Контроль качества забора клинических образцов обеспечивается выявлением в них уникального консервативного участка 15-ой хромосомы человека – ген *LOC107984782 (далее – ДНК человека)*.

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

2.2. Состав набора:

Компонент набора (сокращение) *Описание.*	**Количество**
Положительный контрольный образец (ПКО) *Бесцветная жидкость, содержит натрия азид (0,05%)*	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
Оптическая пленка	3 листа
Вкладыш со штрих-кодом	1 шт.

2.3. Условия применения.

Аналитические и диагностические характеристики набора были валидированы при выделении ДНК из соскобов эпителиальных клеток с использованием наборов **«РеалБест ДНК-экспресс»**, **«Лизирующий раствор»**, **«РеалБест экстракция 100»** и **«РеалБест УниМаг»**, а также из образцов для жидкостной цитологии с использованием наборов **«РеалБест экстракция 100»** и **«РеалБест УниМаг»** производства АО «Вектор-Бест».

Набор применяется с регистрирующими амплификаторами планшетного типа с термоблоком для пробирок объёмом 0,2 мл и каналами детекции **«ROX»**, **«FAM»**, **«HEX»**, **«Cy5»**: «CFX96» *(Bio-Rad Laboratories, Inc., США)*, «ДТпрайм» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)*, «FLUORITE» *(Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай)* или их аналогами, зарегистрированными в установленном порядке в РФ.

Запуск программы амплификации и анализ результатов может производиться с помощью программного обеспечения **«GP.РеалБест Диагностика»** *(размещено на сайте http://www.vector-best.ru)*.

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

Показания к применению.

Набор может быть использован для выявления папилломавирусной инфекции в рамках программ по цервикальному скринингу.

Противопоказаний к применению медицинского изделия нет *(не применимо)*.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность.

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

Набор гарантированно выявляет ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов высокого канцерогенного риска в концентрации 50 копий в ПЦР-пробе *(соответствует 6×10^3 копий ДНК/мл исходного образца при использовании для выделения ДНК наборов «РеалБест ДНК-экспресс» и «Лизирующий раствор» и 2×10^3 копий ДНК/мл исходного образца при использовании для выделения ДНК наборов «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест УниМаг»)* и ДНК человека в концентрации 250 копий в ПЦР-пробе *(соответствует 3×10^4 копий ДНК/мл исходного образца при использовании для выделения ДНК наборов «РеалБест ДНК-экспресс» и «Лизирующий раствор» и 1×10^4 копий ДНК/мл исходного образца при использовании для выделения ДНК наборов «РеалБест экстракция 100» и «РеалБест УниМаг»)*, что контролируется при выпуске набора реагентов тестированием образцов, приготовленных из стандартных образцов предприятия с соответствующим содержанием вирусной ДНК в ПЦР-пробе.

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

3.2. Аналитическая специфичность.

Был проведён *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 перекрёстных реакций исключена.

Аналитическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типов была подтверждена отсутствием перекрёстных ложноположительных сигналов при анализе образцов, содержащих другие вирусы и иные микроорганизмы, которые могут присутствовать в урогенитальном тракте человека *(ВПЧ 26, 53, 73, 82, 6, 11, 44 типов, ВЭБ, ЦМВ, ВПГ-1 и ВПГ-2, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, Ureaplasma species, Trichomonas vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Lactobacillus species, Atopobium vaginae, Prevotella species, Mobiluncus curtisii, Mobiluncus mulieris)* в концентрации 10^6–10^7 копий/мл.

3.3. Диагностическая чувствительность:

– **диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 16 типа**: клинические испытания, проведённые на 68 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 16 типа, показали 100% чувствительность *(интервал 94,7%–100%, с доверительной вероятностью 95%);*

– **диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 18 типа**: клинические испытания, проведённые на 52 положительных образцах, содержащих ДНК ВПЧ 18 типа, показали 100% чувствительность *(интервал 93,2%–100%, с доверительной вероятностью 95%);*

– **диагностическая чувствительность выявления ДНК ВПЧ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типов:** клинические испытания, проведённые на 399 положительном образце, содержащем ДНК ВПЧ 12-ти перечисленных типов, показали 100% чувствительность *(интервал 99,1%–100%, с доверительной вероятностью 95%).*

3.4. Диагностическая специфичность:

– **диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 16 типа:** клинические испытания, проведённые на 471 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 16 типа, показали 100% специфичность *(интервал 99,2%–100%, с доверительной вероятностью 95%);*

– **диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 18 типа:** клинические испытания, проведённые на 487 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 18 типа, показали 100% специфичность *(интервал 99,3%–100%, с доверительной вероятностью 95%);*

– **диагностическая специфичность выявления ДНК ВПЧ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типов:** клинические испытания, проведённые на 140 отрицательных образцах, не содержащих ДНК ВПЧ 12-ти перечисленных типов, показали 100% специфичность *(интервал 97,4%–100%, с доверительной вероятностью 95%).*

3.5. Повторяемость и воспроизводимость.

При тестировании на одной серии набора, на одном оборудовании, одним оператором, в одной лаборатории 12 образцов в 8 повторах каждый повторяемость составила 100%, коэффициент вариации **Ct** не более 3%.

При тестировании двумя операторами на двух сериях набора 12 образцов в 8 повторах каждый межпостановочная, внутрисерийная и межсерийная воспроизводимость результатов составила 100%. Коэффициент вариации **Ct** не более 4%.

3.6. Потенциально интерферирующие вещества.

Показано отсутствие влияния на результаты анализа наличия в исследуемых образцах крови и муцина до 0,5%.

Необходимо исключить использование влагалищных свечей, гелей и мазей, компоненты которых

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

по литературным данным *(методическим указаниям для врачей)* могут влиять на результаты анализа *(см. п. 6.1. данной инструкции по применению)*.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

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

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

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

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

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

4.6. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором дозаторов переменного объёма, 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, Б, В и Г, которые классифицируются и уничтожаются *(утилизируются)* в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических *(профилактических)* мероприятий».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- амплификатор с детекцией флуоресценции в режиме реального времени планшетного типа *(с термоблоком для пробирок объёмом 0,2 мл и каналами детекции: «ROX», «FAM», «HEX», «Cy5»)*: «CFX96» *(Bio-Rad Laboratories, Inc., США)*, «ДТпрайм» *(ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)*, «FLUORITE» *(Xi'an TianLong, Science and Technology Co., Ltd., Китай)* или их аналог, зарегистрированный в установленном порядке в РФ.
- ПЦР-бокс *(например, бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия)*;

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

- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2–8) °С;
- мини-шейкер планшетный, обеспечивающий частоту вращения 1200–1800 об/мин *(например, «PSU-2T», BioSan, Латвия или «Eppendorf MixMate», Eppendorf AG, Германия)*;
- дозаторы одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками *(например, Biohit, Финляндия);*
- одноразовые наконечники для дозаторов с защитным фильтром/аэрозольным барьером *(например, Sartorius, Германия);*
- перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые *(например, перчатки «NeoTouch», Ansell HealthCare, Германия);*
- штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл *(например, SSI, США);*
- контейнер для сбора отходов *(например, «Контейнер для сбора острого инструментария –МК-01», КМ-ПРОЕКТ, Россия);*
- нож канцелярский или ножницы.

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

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

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

Пациент должен быть заранее проинструктирован о правилах подготовки к сдаче соскоба. Соскоб не следует брать:

- ранее 48 часов после полового контакта;
- во время менструации;
- в период лечения генитальных инфекций;
- ранее 48 часов после расширенной кольпоскопии с обработкой 3–5% растворами уксусной кислоты или Люголя, после использования любрикантов, тампонов или спермицидов;
- после вагинального исследования или спринцевания.

Более подробно с правилами забора биоматериала можно ознакомиться в Методических рекомендациях по профилактике рака шейки *матки Министерства здравоохранения РФ (г. Москва, 2018 г., 54 с.)*

Забор биоматериала (*соскобов эпителиальных клеток)* необходимо проводить с помощью одноразовых стерильных урогенитальных зондов *(зарегистрированных в установленном порядке в РФ)* в пробирки с транспортным раствором *(компонент наборов: «РеалБест ДНК-экспресс» (РУ № РЗН 2915/2300), «Транспортный раствор» (РУ РЗН 2017/6004), производства АО «Вектор-Бест»)* или в виалы со средой для жидкостной цитологии, зарегистрированные в установленном порядке в РФ.

6.1. Подготовка анализируемых образцов.

6.1.1. Подготовка соскобов эпителиальных клеток, забранных в транспортный раствор.

При использовании **транспортного раствора** производства АО «Вектор-Бест» транспортировать и хранить образцы:

- *при температуре (18−25) °С до 2 суток;*
- *при температуре (2−8) °С не более 2 недель;*
- *при температуре минус (18−60) °С до 2 месяцев.*

Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

Аккуратно перемешать образцы, добиваясь равномерного распределения биологического материала в пробирке. В случае, если образцы соскобов были заморожены, предварительно разморозить их при комнатной температуре.

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

Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

Выделить ДНК из клинических образцов одним из наборов: **«РеалБест ДНК-экспресс»**, **«Лизирующий раствор»**, **«РеалБест экстракция 100»**, **«РеалБест УниМаг»**, согласно прилагаемой инструкции.

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.

6.1.2. Подготовка соскобов эпителиальных клеток, забранных в среду для жидкостной цитологии.

При использовании флаконов с фиксирующим раствором для жидкостной цитологии транспортировать и хранить образцы согласно рекомендациям фирмы-производителя. Замораживание проб НЕ ДОПУСКАЕТСЯ!

Для обеспечения высокого качества ПЦР-анализа важна сохранность целостности клеток, поэтому максимальный срок хранения образцов для ПЦР-анализа во флаконах с жидким консервантом составляет не более 2–3 суток от момента взятия образца.

Внимание! *В случае необходимости более длительного хранения образцов рекомендуется отбирать из флаконов аликвоту для ПЦР-анализа в отдельную пробирку и хранить такие пробирки в холодильнике при температуре (2–8) °С не более 30 дней (с учётом транспортировки).*

Из флакона с помощью одноразового наконечника с фильтром отобрать аликвоту объёмом не менее 1 мл в чистую одноразовую пробирку объёмом 2 мл. Рекомендуется использовать максимально возможный объём образца *(по возможности объём желательно увеличить до 2 мл).*

Внимание! *Для минимизации вероятности возникновения кросс-контаминации аликвоту образца для исследования методом ПЦР рекомендуется отбирать из флакона первой, перед процедурой приготовления цитологического препарата.*

Пробирки с отобранными аликвотами центрифугировать 10 минут при 3500g *(7 тыс. об/мин для модели MiniSpin).*

Аккуратно удалить надосадочную жидкость таким образом, чтобы в пробирке осталось 100–110 мкл образца *(включая клеточный осадок).*

Выделить ДНК из сконцентрированных клинических образцов одним из наборов: **«РеалБест экстракция 100»**, **«РеалБест УниМаг»**, согласно прилагаемой инструкции.

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-1 и ГРС-2 в упаковках (*не вскрывая!)* при температуре (18–26) °С не менее 30 минут. Затем вскрыть упаковку, аккуратно с помощью канцелярского ножа или ножниц отрезать необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО)* пробирок с ГРС-1 и столько же с ГРС-2. Отрезать пробирки следует вместе с покрывающей их плёнкой.

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

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

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

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

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Необходимое количество *(по числу подготовленных проб, включая контрольные образцы: 1 ОКО и 1 ПКО)* пробирок с ГРС-1 и ГРС-2 пронумеровать *(если необходимо)* и расположить в штативе.

Внимание! *Надписи следует располагать на боковой части пробирок.*

7.2. Аккуратно удалить плёнку, закрывающую пробирки.

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

В каждую пробирку с ГРС-1 и ГРС-2 дозатором, используя для каждого образца индивидуальный наконечник с фильтром, внести по **50 мкл раствора выделенной ДНК**. Время от начала внесения в ГРС до запуска ПЦР должно быть не более 30 минут.

7.3. Заклеить пробирки оптической плёнкой.

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

Поместить пробирки в мини-шейкер. Перемешать содержимое пробирок с частотой вращения 1200–1800 об/мин в течение 1 минуты.

7.4. Поместить пробирки в амплификатор.

При использовании программного обеспечения прибора:

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

Протокол проведения реакции:
1 стадия: 50°С – 10 минут;
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 ВКР**, **ДНК человека**:

- **«Cy5»** – для регистрации сигнала **ДНК ВКО** в ГРС-1 и ГРС-2;
- **«FAM»** – для регистрации сигнала **ДНК ВПЧ 16** в ГРС-1 и для регистрации сигнала **ДНК человека** в ГРС-2;
- **«HEX»** – для регистрации сигнала **ДНК ВПЧ 18** в ГРС-1;
- **«ROX»** – для регистрации сигнала **ДНК ВПЧ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов** в ГРС-1 и в ГРС-2.

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

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

При использовании программы «GP.РеалБест Диагностика»:

7.9. Запустить программное обеспечение **«GP.РеалБест Диагностика»**.

7.10. Со вкладыша с информацией ввести данные штрих-кода набора.

7.11. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми и контрольными образцами.

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

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

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** *(ГРС-1, ГРС-2, канал «Cy5»)* и определять значение порогового цикла **Ct ВКО**;
- нарастание сигнала амплификации **ДНК ВПЧ 16** *(ГРС-1, канал «FAM»)* и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**;
- нарастание сигнала амплификации **ДНК ВПЧ 18** *(ГРС-1, канал «HEX»)* и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**;
- нарастание сигнала амплификации **ДНК ВПЧ ВКР 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов** *(ГРС-1, ГРС-2, канал «ROX»)* и определять значение порогового цикла **Ct ПКО**;

нарастание сигнала амплификации **ДНК человека** *(ГРС-2, канал «FAM»)*.

8.1.2. В **ОКО** в ГРС-1 и ГРС-2 программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО *(канал «Cy5»)* и определять **Ct** ВКО.

В ОКО в ГРС-1 по каналам **«ROX»**, **«FAM»** и **«HEX»** программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК со значением **Ct меньше или равно 40**.

В ОКО в ГРС-2 программа не должна регистрировать нарастания сигнала амплификации ДНК человека *(канал «FAM»)* с **Ct меньше или равно 32**. Также по каналу **«ROX»** программа не должна регистрировать нарастания сигнала специфического продукта амплификации ДНК с **Ct меньше или равно 40**.

Если для ОКО в ГРС-1 значение **Ct** хотя бы по одному из каналов: **«HEX»**, **«ROX»**, **«FAM»**, или в ГРС-2 значение **Ct** по каналу **«ROX» меньше или равно 40**, то это свидетельствует о наличии контаминации ДНК ВПЧ *(см. п. 8.2.4)*.

Если для ОКО в ГРС-2 значение **Ct** по каналу **«FAM» меньше или равно 32**, то это свидетельствует о наличии контаминации ДНК человека *(см. п. 8.2.5)*.

8.1.3. В **каждом исследуемом образце** программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО *(ГРС-1 и ГРС-2)* и ДНК человека *(ГРС-2)* и определять **Ct** ВКО и **Ct** ДНК человека.

Анализируемый образец считается **валидным**, если для этого образца значение **Ct** ДНК человека **меньше или равно 32.**

Для образцов, признанных **невалидными** (***Ct** ДНК человека в ГРС-2 больше 32)* необходимо провести повторный забор материала для исследования.

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

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

8.2. Учёт результатов.

8.2.1. Вычислить для каждой ГРС (**Ct** 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 (**Ct** ВКО)$_{ср}$. После отбраковки пересчитать (**Ct** ВКО)$_{ср}$ для оставшихся значений.

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

Если для такого образца значение **Ct** по каналу **«FAM»** в ГРС-2 *(ДНК человека)* **больше 32**, то

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

результат по данному образцу не подлежит анализу и учёту как отрицательный. Необходимо провести повторный забор образца для исследования.

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

8.2.3. Анализируемый образец считается **положительным** *(содержащим ДНК ВПЧ ВКР)*, если для этого образца значение **Ct** в каком-либо из каналов **«FAM»**, **«HEX»**, **«ROX»** в ГРС-1 и/или по каналу **«ROX»** в ГРС-2 **меньше или равно 40**. Образец содержит ДНК ВПЧ 16, если для этого образца значение **Ct** в канале **«FAM»** в ГРС-1 **меньше или равно 40.** Образец содержит ДНК ВПЧ 18, если для этого образца значение **Ct** в канале «**HEX**» в ГРС-1 **меньше или равно 40.**

8.2.4. В случае контаминации ДНК ВПЧ 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.

8.2.5. В случае контаминации ДНК человека все отрицательные 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 отрицательный результат. Образцы данной постановки, анализ которых дал положительный результат, следует учитывать, как положительные.

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 – 18 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 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.

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

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

По вопросам, касающимся качества набора ***«РеалБест ВПЧ ОнкоСкрин»****, 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

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) 252-51-75

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