

Версия 2023-07-26



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком:

Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14»

Комплект Стандарт
(Кат. № 011/1/1**)

ТУ BY 191655593.011-2023

ВНИМАНИЕ!

Изучите инструкцию перед
началом работы



Производственное унитарное предприятие «Диагенс»

Юридический адрес: 223060, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с, район деревни Большое Стиклево, д. 40, корп. 1, пом. 22

Производственная площадка: Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Купревича, 7, помещение № 162, 360

office@diasens.by
+375 17 320-65-10

Каталожный номер: 011/1/1**

* - дополнительный символ, для уточнения комплектации

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14»
Кат. № 011/1/1**

Diasens
ТУ BY 191655593.011-2023

СОДЕРЖАНИЕ

1. Назначение	3
1.1. Функциональные характеристики	3
1.1.1 Аналитическая специфичность	3
1.1.2 Аналитическая чувствительность	4
1.1.3 Лимит детекции	4
1.1.4 Линейный диапазон измерения	4
1.1.5 Воспроизводимость и повторяемость измерения	4
1.2. Контроль качества тест-систем	4
1.3. Противоконтаминационные меры	5
1.4 Безопасность реагентов	5
2. Комплектация	5
3. Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором	6
4. Методы исследования	7
4.1. Подготовка образца	7
4.2. Подготовка реагентов к применению	8
4.3. Программирование прибора	9
4.4. Анализ и интерпретация результатов	10
4.4.1 Анализ результатов	10
4.4.2 Интерпретация результатов	11
5. Возможные проблемы и их решение	12
6. Условия хранения и транспортировки	13
6.1. Срок годности	13
6.2. Транспортировка	13
6.3. Хранение	13
6.4. Гарантии производителя	13
7. Условные обозначения	14

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Тест-система	тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14»
«Диагенс»	производственное унитарное предприятие «Диагенс»
ВПЧ	вирус папилломы человека
ВКР	высокий канцерогенный риск
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
ГЭ	геномный эквивалент
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ОКЭ	отрицательный контроль экстракции
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция с детекцией результата в режиме реального времени
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
СИЗ	средство индивидуальной защиты
ОСОЧ	объекты среды обитания человека
ПО	программное обеспечение
Ct	Cycle threshold, значение порогового цикла
LoD	Лимит детекции

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14» предназначена для обнаружения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов высокого канцерогенного риска в биологическом материале: соскоб эпителиальных клеток, соскоб или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса, в том числе в транспортную среду для жидкостной цитологии), соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, прямой кишки. Тест-система предназначена для качественного и количественного исследования методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени в лабораторной клинической практике.

Наборы могут применяться для проведения как медицинских, так и научных исследований. Результат исследования учитывается в комплексной диагностике заболевания с целью подтверждения диагноза и мониторинга лечения.

Материалом для проведения исследований служат образцы ДНК, экстрагированные с помощью наборов реагентов, изготовленных Производственным унитарным предприятием «Диасенс», либо наборов с похожими характеристиками других производителей. Функциональные характеристики валидированы при применении полного комплекта производства «Диасенс». В случае необходимости применения реагентов для экстракции других производителей, компания готова оказать содействие в валидации.

Тест-система совместима с амплификаторами планшетного и роторного типа с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. Разработаны Адаптационные методики для применения тест-системы на приборах следующих производителей: «Диасенс» (Беларусь), ООО НПО ДНК-Технология (РФ), Applied Biosystems (США), Corbett Research (Австралия), QIAGEN GmbH (Германия), Bio-Rad Laboratories, Inc (США), Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd (КНР), Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd (КНР), Roche Holding (Швейцария).

При необходимости возможна адаптация протокола для других амплификаторов с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, представленных в лаборатории конечного пользователя набора.

1.1. Функциональные характеристики

- Аналитическая специфичность тест-системы не менее 99,5%.
- Аналитическая чувствительность тест-системы не менее 99%.
- Лимит детекции – $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл (для всех типов ВПЧ).
- Линейный диапазон измерения в пределах от $8 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$.
- Коэффициент вариации при испытаниях воспроизводимости и повторяемости измерений не превышает 5%

1.1.1 Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности тест-системы проводилась методом тестирования коммерческих стандартов и анализа нуклеотидных последовательностей микроорганизмов и генома человека. Анализ показал отсутствие неспецифической реакции в отношении образцов ДНК

человека и ДНК следующих микроорганизмов: *Candida albicans*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus influenzae*, *Leptothrix sp.*, *Mobiluncus sp.*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus pyogenes*, *Trichomonas vaginalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, HSV 1 и 2 типа, CMV, EBV, HHV6, HBV, HIV1,2, HPV (типы 6, 11, 44, 53, 73, 82), VZV, коронавирусов человека.

1.1.2 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выявления ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов составляет не менее 99%. Для оценки использовались коммерческие стандартные образцы и наборы, зарегистрированные в Республике Беларусь.

1.1.3 Лимит детекции

Для выявления диагностически значимого уровня ДНК ВПЧ при учете результатов производится расчет количества ДНК ВПЧ относительно $1 \cdot 10^5$ клеток человека. Лимит детекции для генотипов ВПЧ составляет $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, с учетом достаточного количества клеток человека, что позволяет выявлять вирусную нагрузку от 1 Ig.

Лимит детекции установлен путем анализа серийных разведений коммерческих стандартных образцов.

Лимит детекции зависит от вида биологического материала, используемого способа и реагентов для выделения нуклеиновых кислот, а также конечного объема элюции выделенных нуклеиновых кислот.

1.1.4 Линейный диапазон измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, находится в пределах от $8 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$. Указанные характеристики достигаются при соблюдении условий отбора и пробоподготовки биологического материала.

1.1.5 Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений оценивается по параметру «Коэффициент вариации (CV)», также известному как «Относительное стандартное отклонение». CV показывает степень изменчивости по отношению к среднему показателю выборки.

Оценку воспроизводимости и повторяемости измерений тест-системы «Diasens ВПЧ ВКР-14» проводили путем исследования тест-системой стандартных коммерческих образцов с известной концентрацией от $5 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$ ГЭ/мл. Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 16 повторях, для оценки воспроизводимости – в 32 повторях. По результатам испытаний CV не превышает 5%

1.2. Контроль качества тест-систем

Для оценки валидности этапа амплификации используется эндогенный ВКО, ОКО и положительные контрольные образцы ПКО-1 и ПКО-2. Результаты исследования ВКО и ПКО

должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в паспорте тест-системы. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей.

Отрицательный контроль (ОКО) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК ВПЧ. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, и контроля, начиная с этапа ПЦР.

1.3. Противоконтаминационные меры

Лаборатория, в которой будет использоваться тест-система, должна быть оснащена необходимым оборудованием, а весь рабочий процесс, необходимо выполнять поэтапно в разных зонах, не допуская возвращения образцов в предыдущие зоны. Оператор должен использовать СИЗы, своевременно менять одноразовые наконечники дозаторов и соблюдать базовые принципы работы в чистой зоне.

Рекомендуется не реже одного раза в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами.

Оценка загрязнения проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами.

1.4 Безопасность реагентов

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.
- Вещества, обладающие потенциальной инфекционной природой, отсутствуют.

2. КОМПЛЕКТАЦИЯ

«Diasens ВПЧ ВКР-14» является универсальным диагностиком, для проведения ПЦР-РВ с ДНК из клинического материала. Тест-система позволяет выявлять и оценивать количественно

ДНК вирусов папилломы человека 14 типов высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), с дифференциацией 16 и 18 типов в исследуемом материале.

Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Амплификацию можно проводить с использованием открытых приборов для амплификации с детекцией результата изменения флуоресценции в режиме реального времени.

«Diasens ВПЧ ВКР-14» комплект Стандарт, рассчитан на проведение 100 исследований, представлен в таблице 2.1.

Таблица 2.1 «Diasens ВПЧ ВКР-14» комплект Стандарт

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. ПЦР-реагент	1 шт.	0,50 мл
2. Праймеры ВПЧ ВКР-14	1 шт.	1,00 мл
3. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
4. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
5. ОКО	1 шт.	0,50 мл

Данный комплект представляет собой стандартный набор реагентов, который нужно пропорционально смешать согласно протоколу в таблице 4.2.1. Реагенты перед применением требуется тщательно разморозить и встряхнуть на вортексе. После смешивания развести в пластик совместимый с используемым анализатором. Программа указана в п. 4.3. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках. Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами приведена в таблице 2.2.

Таблица 2.2 Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (96)	до 200 мкл (96)	два вида (192)
	Без дополнительного расходного материала	011/1/1a	-	-	-
	0,2 ПЦР пробирка/одиночная, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/1/1b	011/1/1ba	011/1/1bb	011/1/1bc
	0,2 ПЦР пробирка/в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/1/1c	011/1/1ca	011/1/1cb	011/1/1cc
	0,1 ПЦР пробирка/в стрипе по 4, из оптически прозрачного пластика, для Rotor-Gene	011/1/1d	011/1/1da	011/1/1db	011/1/1dc
	Планшет высокий профиль, прозрачный	011/1/1e	011/1/1ea	011/1/1eb	011/1/1ec
	Планшет высокий профиль, белый	011/1/1f	011/1/1fa	011/1/1fb	011/1/1fc
	Планшет низкий профиль, прозрачный	011/1/1g	011/1/1ga	011/1/1gb	011/1/1gc
	Планшет низкий профиль, белый	011/1/1h	011/1/1ha	011/1/1hb	011/1/1hc

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С НАБОРОМ

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;
- центрифуга-вортекс с функцией центрифугирования и встряхивания;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками или 96 луночные планшеты с оптически прозрачной пленкой – при использовании прибора планшетного типа и комплекта Стандарт;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа и комплекта Стандарт;
- штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов и оборудованием);
- штативы для пробирок объемом 1,5 – 2,0 мл;
- холодильник, поддерживающий температуру от +2 до +8°C, и морозильник, поддерживающий температуру от -16 до -24°C;
- пробирки объемом 1,5 / 2,0 мл при использовании комплекта Стандарт;
- штативы пластиковые для микропробирок объемом 1,5 / 2,0 мл;
- дозаторы полуавтоматические переменного объема (100 – 1000 мкл, 10 – 100 мкл, 5 – 50 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
- средства индивидуальной защиты;
- емкость для сброса наконечников.

4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Подготовка образца

Работу с образцами для исследования до этапа экстракции следует проводить согласно нормам работы с потенциально инфекционным материалом.

Необходимо соблюдать требования к взятию, транспортировке, подготовке и хранению образцов исследуемого материала. Невыполнение данных требований может повлиять на эффективность экстракции НК.

В зависимости от выбранного метода экстракции, а также в случае применения данной тест-системы без этапа экстракции, провести пробоподготовку согласно методическим рекомендациям к набору.

Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

4.2. Подготовка реагентов к применению

Выделение ДНК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией изготовителя реагентов для выделения нуклеиновых кислот.

Внимание! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением исследований.

1. Разморозить все реагенты при комнатной температуре, при этом использование нагрева нежелательно. При возможности, избегать попадание прямых солнечных лучей на компонент «Праймеры ВПЧ ВКР-14» в процессе разморозки.
2. Когда визуально в растворе не наблюдается льда, перемешать компонент переворачивая пробирку или кратковременным встряхиванием на вортексе.
3. Чтобы избежать потерь реагентов от зависания капель на крышке или стенках пробирки необходимо кратковременное центрифугирование от 2 000 об/мин (допустимо выше) не более 30 сек.
4. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 4.2.1 в отдельной чистой пробирке объемом 1,5 – 2,0 мл.

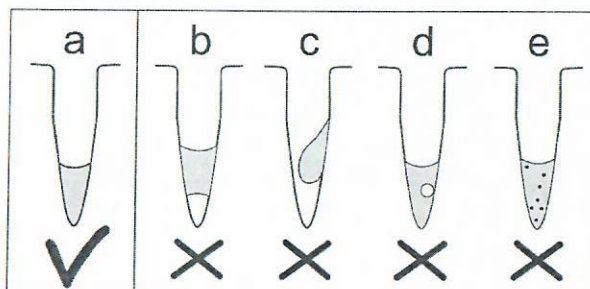
Таблица 4.2.1 Расчёт количества реагентов для реакционной смеси

Количество реагента на реакцию, мкл																			
Количество реакций Реагент	1	5	6	8	10	12	16	24	32	36	40	48	56	64	72	80	88	96	100
ПЦР-реагент	5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Праймеры ВПЧ ВКР-14	10	50	60	80	100	120	160	240	320	360	400	480	560	640	720	800	880	960	1000
Итоговый объем смеси	15	75	90	120	150	180	240	360	480	540	600	720	840	960	1080	1200	1320	1440	1500

При расчёте общего количества каждого компонента нужно учитывать количество реакций, включая исследуемые образцы и контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).

5. Перемешать приготовленную реакционную смесь кратковременным встряхиванием на вортексе не допуская вспенивания, осадить кратковременным центрифугированием.
6. Подготовить пробирки объемом 0,1 – 0,2 мл, совместимые с анализатором, на котором будет проводиться исследование. Разнести реакционную смесь по 15 мкл в пробирки для проведения анализа.
7. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл исследуемых образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке 25 мкл.
8. В пробирки подготовленные для контрольных образцов внести контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).
9. Убедиться, что жидкость в каждой лунке / пробирке находится на дне (рис.1а) и не содержит пузырьков (рис. 1б и 1д) и/или механических примесей (рис.1е).

Рисунок 1 – Наглядное положение жидкости в пробирке / лунке.



10. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок / пробирок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

11. Герметично закрыть пробирки крышками/заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой.

4.3. Программирование прибора

1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки /планшеты в амплификатор.
2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно протоколу амплификации. Обобщенная программа амплификации приведена в таблице 4.3. Программа амплификации зависит от используемого прибора и выбранного варианта комплекта. Более подробная программа амплификации и пошаговое описание настройки прибора для первого запуска приведена в адаптационных методиках. При возникновении необходимости помощи в программировании прибора Вы можете обратиться к производителю (e-mail: pcrproduction@diasens.by, тема: Программирование амплификаторов).

Табл. 4.3 Программа амплификации

№ блока	Тип блока	Шаг	Температура, °С	Время	Детекция	Количество циклов
1	Hold/ Удержание температуры	Начальная денатурация	95	15 мин	–	1
2	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	–	5
		Отжиг	60	15 сек	–	
		Элонгация	72	15 сек	–	
3	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	–	40
		Отжиг	60	15 сек*	+: FAM, HEX**, ROX, Cy5, Cy5.5	
		Элонгация	72	15 сек	–	

* - В случае невозможности задать данное время на приборе, указывается минимальное.

** - Детекция сигнала для флуорофора HEX аналогична флуорофорам R6G, JOE и VIC и может варьироваться.

Ориентировочное время работы прибора 70-90 мин.

3. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.
4. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор*.

Примечание: одновременно можно проводить различные исследования при условии совпадения программ амплификации.

4.4. Анализ и интерпретация результатов

4.4.1 Анализ результатов

Качественное и количественное определение ДНК ВПЧ ВКР основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct).

При проведении качественного теста амплификация ДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с ПКО-1 и ПКО-2, которые выступают в качестве контрольных точек для оценки эффективности протекания амплификации. По результатам амплификации контрольных точек происходит оценка валидности ПЦР-исследования.

При проведении количественного теста ПКО-1 и ПКО-2 выступают в качестве калибраторов - образцов с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия с известной эффективностью амплификации, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах. Полученное значение концентрации ДНК ВПЧ нормируется на $1 \cdot 10^5$ клеток человека для снижения влияния качества забора биологического материала.

1. Параметры анализа для конкретного прибора указаны в адаптационных методиках.
2. После установления значения пороговой линии необходимо выбрать логарифмическую шкалу для отображения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.
3. Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов (см. адаптационные методики).

4. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно, т.е. контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в адаптационных методиках и паспорте.

В случае несоответствия контрольных точек (ОКЭ, ОКО, ПКО-1, ПКО-2) требуемым значениям – анализ необходимо переделать.

5. Для количественного анализа используются значения концентрации ДНК-мишени в ПКО-1 и ПКО-2 (указаны в паспорте). При использовании ПО к амплификатору, калибровочная прямая строится на основании значения C_t автоматически. При применении открытого ПО для оценки вирусной нагрузки, количественная оценка производится автоматически и данные количественной оценки с прибора не требуются. Подробнее данная процедура описана в адаптационных методиках.

В случае невалидного результата (получение невалидного результата по количеству клеток человека) анализ соответствующего образца необходимо переделать, начиная с этапа экстракции ДНК, либо повторить забор материала.

6. Для расчёта качественных и количественных критериев исследования можно использовать электронный файл или ПО, производства УП «Диасенс». Для его получения обратитесь по e-mail: pcrproduction@diasens.by.

4.4.2 Интерпретация результатов

Расчет концентрации ДНК ВПЧ и количество геномных эквивалентов человека проводится на 1 мл исследуемого образца. Полученные значения используются для расчета количества ДНК ВПЧ, приходящегося на 10^5 клеток человека. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека. Нормирование количества возбудителя на 10^5 клеток человека позволяет оценивать клиническую значимость результата и его валидность. Полученные значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия биологического материала.

Интерпретацию диагностической значимости результатов можно провести вручную, либо в автоматическом режиме.

Ручной расчет нормированных значений концентрации ДНК ВПЧ производят по формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{количество копий ДНК ВПЧ в 1 мл}}{\text{количество копий ДНК человека в 1 мл}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{количество копий ДНК ВПЧ на } 10^5 \text{ клеток человека})$$

где 2 – это коэффициент пересчета количества копий ДНК человека в количество клеток. Данный расчет рекомендуется проводить автоматически. Подробный алгоритм количественного анализа изложен в адаптационных методиках.

В случае, если расчёт будет производиться при помощи программного обеспечения производства «Диасенс», он может пройти в автоматическом режиме.

5. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ РЕШЕНИЕ

- Недостоверный результат. Результат является недостоверным при отсутствии сигнала по всем каналам детекции, а также при регистрации слабоположительного сигнала по каналам детекции ДНК ВПЧ при отсутствии сигнала по каналу ДНК человека. К появлению недостоверного результата может привести низкий выход или отсутствие нуклеиновых кислот в элюате. Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК, если это возможно, с применением другого метода экстракции.
- Ингибирование ПЦР.
 - Нарушение протокола экстракции ДНК. При нарушении протокола экстракции ДНК в элюате могут находиться ингибиторы ПЦР. Требуется повторно провести исследование начиная с этапа экстракции ДНК.
 - Попадание в ПЦР-смесь посторонних агентов. Попадание в ПЦР-смесь сорбента или магнитных частиц может привести к ингибированию ПЦР. При внесении нуклеиновых кислот необходимо отслеживать попадание сорбента или магнитных частиц в реакционную смесь, при их наличии – удалить / заменить данную реакционную смесь.
- Контаминация специфичной ДНК. Наличие сигнала по любому из каналов в отрицательном контроле свидетельствует о наличии контаминации. Необходимо принять меры по выявлению и устранению источника загрязнения и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Неправильный анализ результатов
 - Некорректная обработка результатов. Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид прямых линий, идущих снизу-вверх. Положительный образец имеет специфическую S-образную кривую накопления флуоресценции. Необходимо отключить учет первых 5 циклов в соответствии с инструкцией прибора. При необходимости данное значение может быть изменено в диапазоне 5–10 циклов.
 - Неправильный подбор уровня пороговой линии. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.
- Некачественный отбор биоматериала. Отсутствие положительного сигнала по каналу детекции человеческого материала при повторном исследовании свидетельствует о некачественном отборе биоматериала. Требуется повторный отбор биоматериала.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

6.1. Срок годности

Срок годности тест-систем составляет 12 месяцев с даты изготовления. После вскрытия тест-системы использовать до истечения срока годности. На результаты полученные с применением тест-системы с истекшим сроком годности гарантии производителя не распространяются.

6.2. Транспортировка

Транспортировка тест-систем осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше 37 °С (до 5 суток) или при температуре от +2 до +8°С (до 30 суток). Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

6.3. Хранение

Тест-системы хранить при температуре от -16 до -24°С в течение всего срока годности. Допускается замораживание/размораживание тест-системы не более 10 раз. Тест-системы после вскрытия хранить в тех же условиях, что и до вскрытия. На результаты полученные с применением тест-системы, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, гарантии производителя не распространяются.

6.4. Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие тест-систем требованиям, изложенным в технической и эксплуатационной документации, при условии соблюдения всех условий транспортирования, хранения и применения в течение указанного срока годности.

Рекламации по качеству реагентов «Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком» направлять в производственное унитарное предприятие «Диасенс»:

E-mail: perproduction@diasens.by;

Телефон: +375 17 320-65-10;

Почтовый адрес: 223060, Республика Беларусь, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с, р-н д. Большое Стиклево, S-Union, ячейка 43.

При выявлении нежелательных реакций при использовании тест-систем, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: <http://diasens.by/>.

7. УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Символы опасности
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		

Версия 2023-07-26



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком:

Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14»

комплект Стандарт

(кроме кат. №011/1/1)

комплект Планшет

комплект Пробирки

ТУ BY 191655593.011-2023

ВНИМАНИЕ!

Изучите инструкцию перед
началом работы



Производственное унитарное предприятие «Диа́сенс»

Юридический адрес: 223060, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с, район деревни Большое Стиклево, д. 40, корп. 1, пом. 22

Производственная площадка: Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Купревича, 7, помещение № 162, 360

office@diasens.by
+375 17 320-65-10

Каталожный номер: 011/1/**

* - дополнительный символ, для уточнения комплектации

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14»
Стандарт / Планшет / Пробирки

Diasens
ТУ BY 191655593.011-2023

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Назначение	3
1.1.	Функциональные характеристики	3
1.1.1	Аналитическая специфичность	3
1.1.2	Аналитическая чувствительность	4
1.1.3	Лимит детекции	4
1.1.4	Линейный диапазон измерения	4
1.1.5	Воспроизводимость и повторяемость измерения	4
1.2.	Контроль качества тест-систем	4
1.3.	Противоконтаминационные меры	5
1.4.	Безопасность реагентов	5
2.	Комплектация	5
2.1	Комплект Стандарт	6
2.2	Комплект Планшет	7
2.3	Комплект Пробирки	7
3.	Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором	8
4.	Методы исследования	8
4.1.	Подготовка образца	8
4.2.	Подготовка реагентов к применению	9
4.2.1.	Комплект Стандарт	9
4.2.2.	Комплект Планшет	10
4.2.3.	Комплект Пробирки	10
4.3.	Программирование прибора	11
4.4.	Анализ и интерпретация результатов	12
4.4.1.	Анализ результатов	12
4.4.2.	Интерпретация результатов	13
5.	Возможные проблемы и их решение	13
6.	Условия хранения и транспортировки	14
6.1.	Срок годности	14
6.2.	Транспортировка	14
6.3.	Хранение	15
6.4.	Гарантии производителя	15
7.	Условные обозначения	16

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Тест-система	тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14»
«Диа́сенс»	производственное унитарное предприятие «Диа́сенс»
ВПЧ	вирус папилломы человека
ВКР	высокий канцерогенный риск
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
ГЭ	геномный эквивалент
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ОКЭ	отрицательный контроль экстракции
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция с детекцией результата в режиме реального времени
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
СИЗ	средство индивидуальной защиты
ОСОЧ	объекты среды обитания человека
ПО	программное обеспечение
Ct	Cycle threshold, значение порогового цикла
LoD	Лимит детекции

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14» предназначена для обнаружения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов высокого канцерогенного риска в биологическом материале: соскоб эпителиальных клеток, соскоб или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса, в том числе в транспортную среду для жидкостной цитологии), соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, прямой кишки. Тест-система предназначена для качественного и количественного исследования методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени в лабораторной клинической практике.

Наборы могут применяться для проведения как медицинских, так и научных исследований. Результат исследования учитывается в комплексной диагностике заболевания с целью подтверждения диагноза и мониторинга лечения.

Материалом для проведения исследований служат образцы ДНК, экстрагированные с помощью наборов реагентов, изготовленных Производственным унитарным предприятием «Диасенс», либо наборов с похожими характеристиками других производителей. Функциональные характеристики валидированы при применении полного комплекта производства «Диасенс». В случае необходимости применения реагентов для экстракции других производителей, компания готова оказать содействие в валидации.

Тест-система совместима с амплификаторами планшетного и роторного типа с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. Разработаны адаптационные методики для применения тест-системы на приборах следующих производителей: «Диасенс» (Беларусь), ООО НПО ДНК-Технология (РФ), Applied Biosystems (США), Corbett Research (Австралия), QIAGEN GmbH (Германия), Bio-Rad Laboratories, Inc (США), Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd (КНР), Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd (КНР), Roche Holding (Швейцария).

При необходимости возможна адаптация протокола для других амплификаторов с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, представленных в лаборатории конечного пользователя набора.

1.1. Функциональные характеристики

- Аналитическая специфичность тест-системы не менее 99,5%.
- Аналитическая чувствительность тест-системы не менее 99%.
- Лимит детекции – $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл (для всех типов ВПЧ).
- Линейный диапазон измерения в пределах от $8 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$.
- Коэффициент вариации при испытаниях воспроизводимости и повторяемости измерений не превышает 5%.

1.1.1 Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности тест-системы проводилась методом тестирования коммерческих стандартов и анализа нуклеотидных последовательностей микроорганизмов и генома человека. Анализ показал отсутствие неспецифической реакции в отношении образцов ДНК

человека и ДНК следующих микроорганизмов: *Candida albicans*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus influenzae*, *Leptothrix sp.*, *Mobiluncus sp.*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus pyogenes*, *Trichomonas vaginalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, HSV 1 и 2 типа, CMV, EBV, HHV6, HBV, HIV1,2, HPV (типы 6, 11, 44, 53, 73, 82), VZV, коронавирусов человека.

1.1.2 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выявления ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов составляет не менее 99%. Для оценки использовались коммерческие стандартные образцы и наборы, зарегистрированные в Республике Беларусь.

1.1.3 Лимит детекции

Для выявления диагностически значимого уровня ДНК ВПЧ при учете результатов производится расчет количества ДНК ВПЧ относительно $1 \cdot 10^5$ клеток человека. Лимит детекции для генотипов ВПЧ составляет $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, с учетом достаточного количества клеток человека, что позволяет выявлять вирусную нагрузку от 1 lg.

Лимит детекции установлен путем анализа серийных разведений коммерческих стандартных образцов.

Лимит детекции зависит от вида биологического материала, используемого способа и реагентов для выделения нуклеиновых кислот, а также конечного объема элюции выделенных нуклеиновых кислот.

1.1.4 Линейный диапазон измерения

Диапазон, в котором набор даст линейный ответ, находится в пределах от $8 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$. Указанные характеристики достигаются при соблюдении условий отбора и пробоподготовки биологического материала.

1.1.5 Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений оценивается по параметру «Коэффициент вариации (CV)», также известному как «Относительное стандартное отклонение». CV показывает степень изменчивости по отношению к среднему показателю выборки.

Оценку воспроизводимости и повторяемости измерений тест-системы «Diasens ВПЧ ВКР-14» проводили путем исследования тест-системой стандартных коммерческих образцов с известной концентрацией от $5 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$ ГЭ/мл. Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 16 повторях, для оценки воспроизводимости – в 32 повторях. По результатам испытаний CV не превышает 5%.

1.2. Контроль качества тест-систем

Для оценки валидности этапа амплификации используется эндогенный ВКО, ОКО и положительные контрольные образцы ПКО-1 и ПКО-2. Результаты исследования ВКО и ПКО

должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в паспорте тест-системы. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей.

Отрицательный контроль (ОКО) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК ВПЧ. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, и контроля, начиная с этапа ПЦР.

1.3. Противоконтаминационные меры

Лаборатория, в которой будет использоваться тест-система, должна быть оснащена необходимым оборудованием, а весь рабочий процесс, необходимо выполнять поэтапно в разных зонах, не допуская возвращения образцов в предыдущие зоны. Оператор должен использовать СИЗы, своевременно менять одноразовые наконечники дозаторов и соблюдать базовые принципы работы в чистой зоне.

Рекомендуется не реже одного раза в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами.

Оценка загрязнения проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами.

1.4 Безопасность реагентов

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.
- Вещества, обладающие потенциальной инфекционной природой, отсутствуют.

2. КОМПЛЕКТАЦИЯ

«Diasens ВПЧ ВКР-14» является универсальным диагностиком, для проведения ПЦР-РВ с ДНК из клинического материала. Тест-система позволяет выявлять и оценивать количественно ДНК

вирусов папилломы человека 14 типов высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), с дифференциацией 16 и 18 типов в исследуемом материале.

Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Амплификацию можно проводить с использованием открытых приборов для амплификации с детекцией результата изменения флуоресценции в режиме реального времени.

2.1 Комплект Стандарт

«Diasens ВПЧ ВКР-14» комплект Стандарт, рассчитан на проведение 100 исследований, представлен в таблице 2.1.1.

Таблица 2.1.1 «Diasens ВПЧ ВКР-14» комплект Стандарт

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. ПЦР-реагент	1 шт.	0,50 мл
2. Праймеры ВПЧ ВКР-14	1 шт.	0,50 мл
3. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
4. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
5. ОКО	1 шт.	0,50 мл

Данный комплект представляет собой стандартный набор реагентов, который нужно пропорционально смешать согласно протоколу в таблице 4.2.1. Реагенты перед применением требуется тщательно разморозить и встряхнуть на вортексе. После смешивания разнести в пластик совместимый с используемым анализатором. Программа указана в п. 4.3. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках. Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами приведена в таблице 2.1.2.

Таблица 2.1.2 Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (96)	до 200 мкл (96)	два вида (192)
	Без дополнительного расходного материала	011/1/0a	-	-	-
	Без дополнительного расходного материала	011/1/0ad			
	Без дополнительного расходного материала	011/1/0ae			
	0,2 ПЦР пробирка/одиночная, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/1/0b	011/1/0ba	011/1/0bb	011/1/0bc
	0,2 ПЦР пробирка/в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/1/0c	011/1/0ca	011/1/0cb	011/1/0cc
	0,1 ПЦР пробирка/в стрипе по 4, из оптически прозрачного пластика, для Rotor-Gene	011/1/0d	011/1/0da	011/1/0db	011/1/0dc
	Планшет высокий профиль, прозрачный	011/1/0e	011/1/0ea	011/1/0eb	011/1/0ec
	Планшет высокий профиль, белый	011/1/0f	011/1/0fa	011/1/0fb	011/1/0fc
	Планшет низкий профиль, прозрачный	011/1/0g	011/1/0ga	011/1/0gb	011/1/0gc
	Планшет низкий профиль, белый	011/1/0h	011/1/0ha	011/1/0hb	011/1/0hc

2.2 Комплект Планшет

«Diasens ВПЧ ВКР-14» комплект Планшет, рассчитан на проведение 96 исследований, представлен в таблице 2.2.1.

Таблица 2.2.1 «Diasens ВПЧ ВКР-14» комплект Планшет

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. Планшет с ПЦР смесью в высушенном виде	1 шт.	-
2. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
3. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
4. ОКО	1 шт.	0,50 мл

В данном комплекте реагенты находятся на дне лунок планшета в высушенном виде. Перед использованием необходимо удалить защитную пленку и внести образец в соответствующую лунку. Допускается использование планшетов не полностью, для этого необходимо отделить необходимое количество лунок. Программа указана в п. 4.3. Комплект оптимально подходит для планшетных анализаторов. Совместимость вариантов комплекта Планшет с амплификаторами приведена в таблице 2.2.2.

Таблица 2.2.2 Совместимость вариантов комплекта Планшет с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (96)	до 200 мкл (96)	два вида (192)
	высокий профиль, прозрачный	011/1/2a	011/1/2aa	011/1/2ab	011/1/2ac
	высокий профиль, белый	011/1/2b	011/1/2ba	011/1/2bb	011/1/2bc
	низкий профиль, прозрачный	011/1/2c	011/1/2ca	011/1/2cb	011/1/2cc
	низкий профиль, белый	011/1/2d	011/1/2da	011/1/2db	011/1/2dc

2.3 Комплект Пробирки

«Diasens ВПЧ ВКР-14» комплект Пробирки, рассчитан на проведение 96 исследований, представлена в таблице 2.3.1.

Таблица 2.3.1 «Diasens ВПЧ ВКР-14» комплект Пробирки

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. Пробирки с ПЦР смесью в высушенном виде	96 шт.	-
2. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
3. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
4. ОКО	1 шт.	0,50 мл

В данном комплекте реагенты находятся на дне пробирок в высушенном виде. Перед использованием необходимо внести образец. Программа указана в п. 4.3. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках. Совместимость вариантов комплекта Пробирки с амплификаторами приведена в таблице 2.3.2.

Таблица 2.3.2 Совместимость вариантов комплекта Пробирки с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт	
		до 20 мкл	до 200 мкл
011/1/3a	0,2 ПЦР пробирка/одиночная или в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	нет	нет
011/1/3b	-/-	да (96)	нет
011/1/3c	-/-	нет	да (96)
011/1/3d	-/-	да (96)	да (96)

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С НАБОРОМ

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;
- центрифуга-вортекс с функцией центрифугирования и встряхивания;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками или 96 луночные планшеты с оптически прозрачной пленкой – при использовании прибора планшетного типа и комплекта Стандарт;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа и комплекта Стандарт;
- штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов и оборудованием);
- штативы для пробирок объемом 1,5 – 2,0 мл;
- холодильник, поддерживающий температуру от +2 до +8°C, и морозильник, поддерживающий температуру от -16 до -24°C;
- пробирки объемом 1,5 / 2,0 мл при использовании комплекта Стандарт;
- штативы пластиковые для микропробирок объемом 1,5 / 2,0 мл;
- дозаторы полуавтоматические переменного объема (100 – 1000 мкл, 10 – 100 мкл, 5 – 50 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
- средства индивидуальной защиты;
- емкость для сброса наконечников.

4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Подготовка образца

Работу с образцами для исследования до этапа экстракции следует проводить согласно нормам работы с потенциально инфекционным материалом.

Необходимо соблюдать требования к взятию, транспортировке, подготовке и хранению образцов исследуемого материала. Невыполнение данных требований может повлиять на эффективность экстракции НК.

В зависимости от выбранного метода экстракции, а также в случае применения данной тест-системы без этапа экстракции, провести пробоподготовку согласно методическим рекомендациям к набору.

Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их

учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

4.2. Подготовка реагентов к применению

Выделение ДНК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией изготовителя реагентов для выделения нуклеиновых кислот.

Внимание! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением исследований.

4.2.1. Комплект Стандарт

1. Разморозить все реагенты при комнатной температуре, при этом использование нагрева не желательно. При возможности, избегать попадание прямых солнечных лучей на компонент «Праймеры ВПЧ ВКР-14» в процессе разморозки.
2. Когда визуально в растворе не наблюдается льда, перемешать компонент переворачивая пробирку или кратковременным встряхиванием на вортексе.
3. Чтобы избежать потерь реагентов от зависания капель на крышке или стенках пробирки необходимо кратковременное центрифугирование от 2 000 об/мин (допустимо выше) не более 30 сек.
4. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 4.2.1 в отдельной чистой пробирке объемом 1,5 – 2,0 мл:

Таблица 4.2.1 Расчёт количества реагентов для реакционной смеси

Количество реакций Реагент		Количество реагента на реакцию, мкл																		
		1	5	6	8	10	12	16	24	32	36	40	48	56	64	72	80	88	96	100
ПЦР-реагент		5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Праймеры ВПЧ ВКР-14		5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Итоговый объем смеси		10	50	60	80	100	120	160	240	320	360	400	480	560	640	720	800	880	960	1000

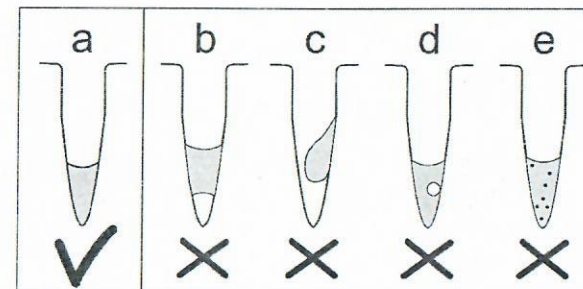
При расчёте общего количества каждого компонента нужно учитывать количество реакций, включая исследуемые образцы и контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).

При расчете общего объема каждого реагента, нужно учитывать количество реакций, в том числе исследуемые образцы и контроли. (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).

5. Перемешать приготовленную реакционную смесь кратковременным встряхиванием на вортексе не допуская вспенивания, осадить кратковременным центрифугированием.
6. Подготовить пробирки объемом 0,1 – 0,2 мл, совместимые с анализатором, на котором будет проводиться исследование. Разнести реакционную смесь по 10 мкл в пробирки для проведения анализа.
7. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл исследуемых образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке 20 мкл.
8. В пробирки подготовленные для контрольных образцов внести контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).

9. Убедитесь, что жидкость в каждой лунке / пробирке находится на дне (рис. 1а) и не содержит пузырьков (рис. 1б и 1д) и/или механических примесей (рис. 1е).

Рисунок 1 – Наглядное положение жидкости в пробирке / лунке.



10. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок / пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. При попадании магнитных частиц – удалить загрязнитель, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
11. Герметично закрыть пробирки крышками/заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой.

4.2.2 Комплект Планшет

1. Снять упаковочную пленку с планшета с ПЦР-смесью.
2. Используя наконечник с фильтром в подготовленные лунки добавить по 20 мкл исследуемых и контрольных образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 лунке 20 мкл.
3. Убедитесь, что жидкость в каждой лунке находится на дне (рис. 1а) и не содержит пузырьков (рис. 1б и 1д) и/или механических примесей (рис. 1е).
4. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
5. Герметично заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой. Не использовать упаковочную пленку!

4.2.3. Комплект Пробирки

1. Подготовить необходимое количество пробирок. При расчёте общего количества нужно учитывать количество реакций, включая исследуемые образцы и контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).
2. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 20 мкл исследуемых и контрольных образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке 20 мкл.

- Убедитесь, что жидкость в каждой пробирке находится на дне (рис.1а) и не содержит пузырьков (рис. 1b и 1d) и/или механических примесей (рис.1е).
- В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
- Герметично закрыть пробирки крышками.

4.3. Программирование прибора

- Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки /планшеты в амплификатор.
- В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно протоколу амплификации. Обобщенная программа амплификации приведена в таблице 4.3. Программа амплификации зависит от используемого прибора и выбранного варианта комплекта. Более подробная программа амплификации и пошаговое описание настройки прибора для первого запуска приведена в адаптационных методиках. При возникновении необходимости помощи в программировании прибора Вы можете обратиться к производителю (e-mail: pcrproduction@diasens.by, тема: Программирование амплификаторов).

Таблица 4.3 Программа амплификации

№ блока	Тип блока	Шаг	Температура, °C	Время	Детекция	Количество циклов
1	Hold/ Удержание температуры	Начальная денатурация	95	2 мин	–	1
2	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	–	5
		Отжиг	60	15 сек	–	
		Элонгация	67	15 сек	–	
3	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	–	40
		Отжиг	60	15 сек*	+: FAM, HEX**, ROX, Cy5, Cy5.5	
		Элонгация	67	15 сек	–	

* - В случае невозможности задать данное время на приборе, указывается минимальное.

** - Детекция сигнала для флуорофора HEX аналогична флуорофорам R6G, JOE и VIC и может варьироваться.

Ориентировочное время работы прибора 70-90 мин.

- В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения

амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.

- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

Примечание: одновременно можно проводить различные исследования при условии совпадения программ амплификации.

4.4. Анализ и интерпретация результатов

4.4.1 Анализ результатов

Качественное и количественное определение ДНК ВПЧ основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct).

При проведении качественного теста амплификация ДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с ПКО-1 и ПКО-2, которые выступают в качестве контрольных точек для оценки эффективности протекания амплификации. По результатам амплификации контрольных точек происходит оценка валидности ПЦР-исследования.

При проведении количественного теста ПКО-1 и ПКО-2 выступают в качестве калибраторов - образцов с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия с известной эффективностью амплификации, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах. Полученное значение концентрации ДНК ВПЧ нормируется на $1 \cdot 10^5$ клеток человека для снижения влияния качества забора биологического материала.

- Параметры анализа для конкретного прибора указаны в адаптационных методиках.
- После установления значения пороговой линии необходимо выбрать логарифмическую шкалу для отображения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.
- Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов (см. адаптационные методики).
- Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно, т.е. контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в адаптационных методиках и паспорте.

В случае несоответствия контрольных точек (ОКЭ, ОКО, ПКО-1, ПКО-2) требуемым значениям – анализ необходимо переделать.

- Для количественного анализа используются значения концентрации ДНК-мишени в ПКО-1 и ПКО-2 (указаны в паспорте). При использовании ПО к амплификатору,

калибровочная прямая строится на основании значения St автоматически. При применении открытого ПО для оценки вирусной нагрузки, количественная оценка производится автоматически и данные количественной оценки с прибора не требуются. Подробнее данная процедура описана в адаптационных методиках.

В случае невалидного результата (получение невалидного результата по количеству клеток человека) анализ соответствующего образца необходимо переделать, начиная с этапа экстракции ДНК, либо повторить забор материала.

6. Для расчёта качественных и количественных критериев исследования можно использовать электронный файл или ПО, производства УП «Диасенс». Для его получения обратитесь по e-mail: pcrproduction@diasens.by

4.4.2 Интерпретация результатов

Расчет концентрации ДНК ВПЧ и количество геномных эквивалентов человека проводится на 1 мл исследуемого образца. Полученные значения используются для расчета количества ДНК ВПЧ, приходящегося на 10^5 клеток человека. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека. Нормирование количества возбудителя на 10^5 клеток человека позволяет оценивать клиническую значимость результата и его валидность. Полученные значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия биологического материала.

Интерпретацию диагностической значимости результатов можно провести вручную, либо в автоматическом режиме.

Ручной расчет нормированных значений концентрации ДНК ВПЧ производят по формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{количество копий ДНК ВПЧ в 1 мл}}{\text{количество копий ДНК человека в 1 мл}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{количество копий ДНК ВПЧ на } 1 \cdot 10^5 \text{ клеток человека})$$

где 2 – это коэффициент пересчета количества копий ДНК человека в количество клеток. Данный расчет рекомендуется проводить автоматически. Подробный алгоритм количественного анализа изложен в адаптационных методиках.

В случае, если расчёт будет производиться при помощи программного обеспечения производства «Диасенс», он может пройти в автоматическом режиме.

5. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ РЕШЕНИЕ

- Недостоверный результат. Результат является недостоверным при отсутствии сигнала по всем каналам детекции, а также при регистрации слабopоложительного сигнала по каналам детекции ДНК ВПЧ при отсутствии сигнала по каналу ДНК человека. К появлению недостоверного результата может привести низкий выход или отсутствие нуклеиновых кислот в элюате. Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК, если это возможно, с применением другого метода экстракции.

- Ингибирование ПЦР.
 - Нарушение протокола экстракции ДНК. При нарушении протокола экстракции ДНК в элюате могут находиться ингибиторы ПЦР. Требуется повторно провести исследование начиная с этапа экстракции ДНК.
 - Попадание в ПЦР-смесь посторонних агентов. Попадание в ПЦР-смесь сорбента или магнитных частиц может привести к ингибированию ПЦР. При внесении нуклеиновых кислот необходимо отслеживать попадание сорбента или магнитных частиц в реакционную смесь, при их наличии – удалить / заменить данную реакционную смесь.
- Контаминация специфичной ДНК. Наличие сигнала по любому из каналов в отрицательном контроле свидетельствует о наличии контаминации. Необходимо принять меры по выявлению и устранению источника загрязнения и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Неправильный анализ результатов
 - Некорректная обработка результатов. Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид прямых линий, идущих снизу-вверх. Положительный образец имеет специфическую S-образную кривую накопления флуоресценции. Необходимо отключить учет первых 5 циклов в соответствии с инструкцией прибора. При необходимости данное значение может быть изменено в диапазоне 5–10 циклов.
 - Неправильный подбор уровня пороговой линии. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.
- Некачественный отбор биоматериала. Отсутствие положительного сигнала по каналу детекции человеческого материала при повторном исследовании свидетельствует о некачественном отборе биоматериала. Требуется повторный отбор биоматериала.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

6.1. Срок годности

Срок годности тест-систем составляет 12 месяцев с даты изготовления. После вскрытия тест-системы использовать до истечения срока годности. На результаты полученные с применением тест-системы с истекшим сроком годности гарантии производителя не распространяются.

6.2. Транспортировка

Транспортировка тест-систем осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше 37 °С (до 5 суток) или при температуре от +2 до +8 °С (до 30 суток). Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

6.3. Хранение

Тест-системы хранить при температуре от -16 до -24°C в течение всего срока годности. Допускается замораживание/размораживание тест-системы не более 10 раз. Тест-системы после вскрытия хранить в тех же условиях, что и до вскрытия. На результаты полученные с применением тест-системы, хранившейся с нарушением указанного режима хранения, гарантии производителя не распространяются.

6.4. Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие тест-систем требованиям, изложенным в технической и эксплуатационной документации, при условии соблюдения всех условий транспортирования, хранения и применения в течение указанного срока годности.

Рекламации по качеству реагентов «Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком» направлять в производственное унитарное предприятие «Диасенс»:

E-mail: pcrproduction@diasens.by;

Телефон: +375 17 320-65-10;

Почтовый адрес: 223060, Республика Беларусь, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с, р-н д. Большое Стиклево, S-Union, ячейка 43.

При выявлении нежелательных реакций при использовании тест-систем, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: <http://diasens.by/>.

7. УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Символы опасности
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		

Версия 2023-07-26



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком:

Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-16, 18»

комплект Стандарт

комплект Планшет

комплект Пробирки

ТУ BY 191655593.011-2023

ВНИМАНИЕ!

Изучите инструкцию перед
началом работы



Производственное унитарное предприятие «Диагенс»

Юридический адрес: 223060, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с, район деревни Большое Стиклево, д. 40, корп. 1, пом. 22

Производственная площадка: Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Купревича, 7, помещение № 162, 360

office@diasens.by
+375 17 320-65-10

Каталожный номер: 011/2/**

* - дополнительный символ, для уточнения комплектации

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-16, 18»
Стандарт / Планшет / Пробирки

Diasens
ТУ BY 191655593.011-2023

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Назначение.....	3
1.1.	Функциональные характеристики.....	3
1.1.1	Аналитическая специфичность.....	4
1.1.2	Аналитическая чувствительность.....	4
1.1.4	Линейный диапазон измерения.....	4
1.1.5	Воспроизводимость и повторяемость измерения.....	4
1.2.	Контроль качества тест-систем.....	5
1.3.	Противоконтаминационные меры.....	5
1.4	Безопасность реагентов.....	5
2.	Комплектация.....	6
2.1	Комплект Стандарт.....	6
2.2	Комплект Планшет.....	7
2.3	Комплект Пробирки.....	7
3.	Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором.....	8
4.	Методы исследования.....	8
4.1.	Подготовка образца.....	8
4.2.	Подготовка реагентов к применению.....	9
4.2.1.	Комплект Стандарт.....	9
4.2.2	Комплект Планшет.....	10
4.2.3.	Комплект Пробирки.....	11
4.3.	Программирование прибора.....	11
4.4.	Анализ и интерпретация результатов.....	12
4.4.1	Анализ результатов.....	12
4.4.2	Интерпретация результатов.....	13
5.	Возможные проблемы и их решения.....	14
6.	Условия хранения и транспортировки.....	14
6.1.	Срок годности.....	15
6.2.	Транспортировка.....	15
6.3.	Хранение.....	15
6.4.	Гарантии производителя.....	15
7.	Условные обозначения.....	16

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Тест-система	тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-16, 18»
«Диагенс»	производственное унитарное предприятие «Диагенс»
ВПЧ	вирус папилломы человека
ВКР	высокий канцерогенный риск
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
ГЭ	геномный эквивалент
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ОКЭ	отрицательный контроль экстракции
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция с детекцией результата в режиме реального времени
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
СИЗ	средство индивидуальной защиты
ОСОЧ	объекты среды обитания человека
ПО	программное обеспечение
Ct	Cycle threshold, значение порогового цикла
LoD	Лимит детекции

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-16, 18» предназначена для обнаружения ДНК вирусов папилломы человека 16 и 18 типов высокого канцерогенного риска в биологическом материале: соскоб эпителиальных клеток, соскоб или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса, в том числе в транспортную среду для жидкостной цитологии), соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, прямой кишки. Тест-система предназначена для качественного и количественного исследования методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени в лабораторной клинической практике.

Наборы могут применяться для проведения как медицинских, так и научных исследований. Результат исследования учитывается в комплексной диагностике заболевания с целью подтверждения диагноза и мониторинга лечения.

Материалом для проведения исследований служат образцы ДНК, экстрагированные с помощью наборов реагентов, изготовленных Производственным унитарным предприятием «Диасенс», либо наборов с похожими характеристиками других производителей. Функциональные характеристики валидированы при применении полного комплекта производства «Диасенс». В случае необходимости применения реагентов для экстракции других производителей, компания готова оказать содействие в валидации.

Тест-система совместима с амплификаторами планшетного и роторного типа с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. Разработаны адаптационные методики для применения тест-системы на приборах следующих производителей: «Диасенс» (Беларусь), ООО НПО ДНК-Технология (РФ), Applied Biosystems (США), Corbett Research (Австралия), QIAGEN GmbH (Германия), Bio-Rad Laboratories, Inc (США), Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd (КНР), Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd (КНР), Roche Holding (Швейцария).

При необходимости возможна адаптация протокола для других амплификаторов с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, представленных в лаборатории конечного пользователя набора.

1.1. Функциональные характеристики

- Аналитическая специфичность тест-системы не менее 99,5%.
- Аналитическая чувствительность тест-системы не менее 99%.
- Лимит детекции – $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл (для всех типов ВПЧ).
- Линейный диапазон измерения в пределах от $8 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$.
- Коэффициент вариации при испытаниях воспроизводимости и повторяемости измерений не превышает 5%.

1.1.1 Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности тест-системы проводилась методом тестирования коммерческих стандартов и анализа нуклеотидных последовательностей микроорганизмов и генома человека. Анализ показал отсутствие неспецифической реакции в отношении образцов ДНК человека и ДНК следующих микроорганизмов: *Candida albicans*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus influenzae*, *Leptothrix sp.*, *Mobiluncus sp.*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus pyogenes*, *Trichomonas vaginalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, HSV 1 и 2 типа, CMV, EBV, HHV6, HBV, HIV1,2, HPV (типы 6, 11, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), VZV, коронавирусов человека.

1.1.2 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выявления ДНК вирусов папилломы человека 16 и 18 типов составляет не менее 99%. Для оценки использовались коммерческие стандартные образцы и наборы, зарегистрированные в Республике Беларусь.

1.1.3 Лимит детекции

Для выявления диагностически значимого уровня ДНК ВПЧ при учете результатов производится расчет количества ДНК ВПЧ относительно $1 \cdot 10^5$ клеток человека. Лимит детекции для генотипов ВПЧ составляет $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, с учетом достаточного количества клеток человека, что позволяет выявлять вирусную нагрузку от 1 Ig.

Лимит детекции установлен путем анализа серийных разведений коммерческих стандартных образцов.

Лимит детекции зависит от вида биологического материала, используемого способа и реагентов для выделения нуклеиновых кислот, а также конечного объема элюции выделенных нуклеиновых кислот.

1.1.4 Линейный диапазон измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, находится в пределах от $8 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$. Указанные характеристики достигаются при соблюдении условий отбора и пробоподготовки биологического материала.

1.1.5 Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений оценивается по параметру «Коэффициент вариации (CV)», также известному как «Относительное стандартное отклонение». CV показывает степень изменчивости по отношению к среднему показателю выборки.

Оценку воспроизводимости и повторяемости измерений тест-системы «Diasens ВПЧ ВКР-16, 18» проводили путем исследования тест-системой стандартных коммерческих образцов с известной концентрацией от $5 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$ ГЭ/мл. Тестирование каждого разведения для оценки

повторяемости проводилось в 16 повторях, для оценки воспроизводимости – в 32 повторях. По результатам испытаний CV не превышает 5%

1.2. Контроль качества тест-систем

Для оценки валидности этапа амплификации используется эндогенный ВКО, ОКО и положительные контрольные образцы ПКО-1 и ПКО-2. Результаты исследования ВКО и ПКО должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в паспорте тест-системы. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей.

Отрицательный контроль (ОКО) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК ВПЧ. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, и контроля, начиная с этапа ПЦР.

1.3. Противооконтаминационные меры

Лаборатория, в которой будет использоваться тест-система, должна быть оснащена необходимым оборудованием, а весь рабочий процесс, необходимо выполнять поэтапно в разных зонах, не допуская возвращения образцов в предыдущие зоны. Оператор должен использовать СИЗы, своевременно менять одноразовые наконечники дозаторов и соблюдать базовые принципы работы в чистой зоне.

Рекомендуется не реже одного раза в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами.

Оценка загрязнения проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами.

1.4 Безопасность реагентов

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.

- Репродуктивная токсичность отсутствует.

- Вещества, обладающие потенциальной инфекционной природой, отсутствуют.

2. КОМПЛЕКТАЦИЯ

«Diasens ВПЧ ВКР-16, 18» является универсальным диагностикумом, для проведения ПЦР-РВ с ДНК из клинического материала. Тест-система позволяет выявлять и оценивать количественно ДНК вирусов папилломы человека 16 и 18 типов высокого канцерогенного риска с дифференциацией 16 и 18 типов в исследуемом материале.

Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Амплификацию можно проводить с использованием открытых приборов для амплификации с детекцией результата изменения флуоресценции в режиме реального времени.

2.1 Комплект Стандарт

«Diasens ВПЧ ВКР-16, 18» комплект Стандарт, рассчитан на проведение 100 исследований, представлен в таблице 2.1.1.

Таблица 2.1.1 «Diasens ВПЧ ВКР-16, 18» комплект Стандарт

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. ПЦР-реагент	1 шт.	0,50 мл
2. Праймеры ВПЧ 16, 18	1 шт.	0,50 мл
3. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
4. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
5. ОКО	1 шт.	0,50 мл

Данный комплект представляет собой стандартный набор реагентов, который нужно пропорционально смешать согласно протоколу в таблице 4.2.1. Реагенты перед применением требуется тщательно разморозить и встряхнуть на вортексе. После смешивания разнести в пластик совместимый с используемым анализатором. Программа указана в п. 4.3. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках. Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами приведена в таблице 2.1.2.

Таблица 2.1.2 Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (96)	до 200 мкл (96)	два вида (192)
	Без дополнительного расходного материала	011/2/1a	-	-	-
	0,2 ПЦР пробирка/одиночная, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/2/1b	011/2/1ba	011/2/1bb	011/2/1bc
	0,2 ПЦР пробирка/в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/2/1c	011/2/1ca	011/2/1cb	011/2/1cc
	0,1 ПЦР пробирка/в стрипе по 4, из оптически прозрачного пластика, для Rotor-Gene	011/2/1d	011/2/1da	011/2/1db	011/2/1dc
	Планшет высокий профиль, прозрачный	011/2/1e	011/2/1ea	011/2/1eb	011/2/1ec
	Планшет высокий профиль, белый	011/2/1f	011/2/1fa	011/2/1fb	011/2/1fc

	Планшет низкий профиль, прозрачный	011/2/1g	011/2/1ga	011/2/1gb	011/2/1gc
	Планшет низкий профиль, белый	011/2/1h	011/2/1ha	011/2/1hb	011/2/1hc

2.2 Комплект Планшет

«Diasens ВПЧ ВКР-16, 18» комплект Планшет, рассчитан на проведение 96 исследований, представлен в таблице 2.2.1.

Таблица 2.2.1 «Diasens ВПЧ ВКР-16, 18» комплект Планшет

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. Планшет с ПЦР смесью в высушенном виде	1 шт.	-
2. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
3. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
4. ОКО	1 шт.	0,50 мл

В данном комплекте реагенты находятся на дне лунок планшета в высушенном виде. Перед использованием необходимо удалить защитную пленку и внести образец в соответствующую лунку. Допускается использование планшетов не полностью, для этого необходимо отделить необходимое количество лунок. Программа указана в п. 4.3. Комплект оптимально подходит для планшетных анализаторов. Совместимость вариантов комплекта Планшет с амплификаторами приведена в таблице 2.2.2.

Таблица 2.2.2 Совместимость вариантов комплекта Планшет с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (96)	до 200 мкл (96)	два вида (192)
	высокий профиль, прозрачный	011/2/2a	011/2/2aa	011/2/2ab	011/2/2ac
	высокий профиль, белый	011/2/2b	011/2/2ba	011/2/2bb	011/2/2bc
	низкий профиль, прозрачный	011/2/2c	011/2/2ca	011/2/2cb	011/2/2cc
	низкий профиль, белый	011/2/2d	011/2/2da	011/2/2db	011/2/2dc

2.3 Комплект Пробирки

«Diasens ВПЧ ВКР- 16, 18» комплект Пробирки, рассчитан на проведение 96 исследований, представлен в таблице 2.3.1.

Таблица 2.3.1 «Diasens ВПЧ ВКР-16, 18» комплект Пробирки

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. Пробирки с ПЦР смесью в высушенном виде	96 шт.	-
2. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
3. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
4. ОКО	1 шт.	0,50 мл

В данном комплекте реагенты находятся на дне пробирок в высушенном виде. Перед использованием необходимо внести образец. Программа указана в п. 4.3. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках. Совместимость вариантов комплекта Пробирки с амплификаторами приведена в таблице 2.3.2.

Таблица 2.3.2 Совместимость вариантов комплекта Пробирки с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт	
		до 20 мкл	до 200 мкл
011/2/3a	0,2 ПЦР пробирка/одиночная или в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	нет	нет
011/2/3b	-/-	да (96)	нет
011/2/3c	-/-	нет	да (96)
011/2/3d	-/-	да (96)	да (96)

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С НАБОРОМ

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
- центрифуга-вортес с функцией центрифугирования и встряхивания;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками или 96 луночные планшеты с оптически прозрачной пленкой – при использовании прибора планшетного типа и комплекта Стандарт;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа и комплекта Стандарт;
- штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов и оборудованием);
- штативы для пробирок объемом 1,5 – 2,0 мл;
- холодильник, поддерживающий температуру от +2 до +8°C, и морозильник, поддерживающий температуру от -16 до -24°C;
- пробирки объемом 1,5 / 2,0 мл при использовании комплекта Стандарт;
- штативы пластиковые для микропробирок объемом 1,5 / 2,0 мл;
- дозаторы полуавтоматические переменного объема (100 – 1000 мкл, 10 – 100 мкл, 5 – 50 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
- средства индивидуальной защиты;
- емкость для сброса наконечников.

4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Подготовка образца

Работу с образцами для исследования до этапа экстракции следует проводить согласно нормам работы с потенциально инфекционным материалом.

Необходимо соблюдать требования к взятию, транспортировке, подготовке и хранению образцов исследуемого материала. Невыполнение данных требований может повлиять на эффективность экстракции НК.

В зависимости от выбранного метода экстракции, а также в случае применения данной тест-системы без этапа экстракции, провести пробоподготовку согласно методическим рекомендациям к набору.

Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

4.2. Подготовка реагентов к применению

Выделение ДНК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией изготовителя реагентов для выделения нуклеиновых кислот.

Внимание! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением исследований.

4.2.1. Комплект Стандарт

- Разморозить все реагенты при комнатной температуре, при этом использование нагрева нежелательно. При возможности, избегать попадания прямых солнечных лучей на компонент «Праймеры ВПЧ 16, 18» в процессе разморозки.
- Когда визуально в растворе не наблюдается льда, перемешать компонент переворачивая пробирку или кратковременным встряхиванием на вортексе.
- Чтобы избежать потерь реагентов от зависания капель на крышке или стенках пробирки необходимо кратковременное центрифугирование от 2 000 об/мин (допустимо выше) не более 30 сек.
- Приготовить реакционную смесь согласно таблице 4.2.1 в отдельной чистой пробирке объемом 1,5 – 2,0 мл:

Таблица 4.2.1 Расчёт количества реагентов для реакционной смеси

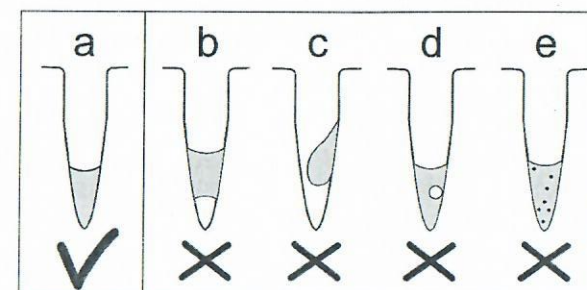
Количество реакций Реагент	Количество реагента на реакцию, мкл																		
	1	5	6	8	10	12	16	24	32	36	40	48	56	64	72	80	88	96	100
ПЦР-реагент	5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Праймеры ВПЧ 16, 18	5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Итоговый объем смеси	10	50	60	80	100	120	160	240	320	360	400	480	560	640	720	800	880	960	1000

При расчёте общего количества каждого компонента нужно учитывать количество реакций, включая исследуемые образцы и контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).

- Перемешать приготовленную реакционную смесь кратковременным встряхиванием на вортексе не допуская вспенивания, осадить кратковременным центрифугированием.

- Подготовить пробирки объемом 0,1 – 0,2 мл, совместимые с анализатором, на котором будет проводиться исследование. Разнести реакционную смесь по 10 мкл в пробирки для проведения анализа.
- Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл исследуемых образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке 20 мкл.
- В пробирки подготовленные для контрольных образцов внести контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).
- Убедитесь, что жидкость в каждой лунке / пробирке находится на дне (рис.1а) и не содержит пузырьков (рис. 1b и 1d) и/или механических примесей (рис.1е).

Рисунок 1 – Наглядное положение жидкости в пробирке / лунке.



- В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок / пробирок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
- Герметично закрыть пробирки крышками/заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой.

4.2.2 Комплект Планшет

- Снять упаковочную пленку с планшета с ПЦР-смесью.
- Используя наконечник с фильтром в подготовленные лунки добавить по 20 мкл исследуемых и контрольных образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 лунке 20 мкл.
- Убедитесь, что жидкость в каждой лунке находится на дне (рис.1а) и не содержит пузырьков (рис. 1b и 1d) и/или механических примесей (рис.1е).
- В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
- Герметично заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой. Не использовать упаковочную пленку!

4.2.3. Комплект Пробирки

1. Подготовить необходимое количество пробирок. При расчёте общего количества нужно учитывать количество реакций, включая исследуемые образцы и контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).
2. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 20 мкл исследуемых и контрольных образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке 20 мкл.
3. Убедитесь, что жидкость в каждой пробирке находится на дне (рис. 1a) и не содержит пузырьков (рис. 1b и 1d) и/или механических примесей (рис. 1e).
4. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избежать попадания сорбента в реакционную смесь.
5. Герметично закрыть пробирки крышками.

4.3. Программирование прибора

1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки /планшет в амплификатор.
2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно протоколу амплификации. Обобщенная программа амплификации приведена в таблице 4.3. Программа амплификации зависит от используемого прибора и выбранного варианта комплекта. Более подробная программа амплификации и пошаговое описание настройки прибора для первого запуска приведена в адаптационных методиках. При возникновении необходимости помощи в программировании прибора Вы можете обратиться к производителю (e-mail: pcrproduction@diasens.by, тема: Программирование амплификаторов).

Табл. 4.3 Программа амплификации

№ блока	Тип блока	Шаг	Температура, °C	Время	Детекция	Количество циклов
1	Hold/ Удержание температуры	Начальная денатурация	95	2 мин	–	1
2	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	–	5
		Отжиг	60	15 сек	–	
		Элонгация	67	15 сек	–	
3	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	–	40
		Отжиг	60	15 сек*	+: FAM, HEX**, ROX	
		Элонгация	67	15 сек	–	

* - В случае невозможности задать данное время на приборе, указывается минимальное.

** - Детекция сигнала для флуорофора HEX аналогична флуорофорам R6G, JOE и VIC и может варьироваться.

Ориентировочное время работы прибора 70-90 мин.

3. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.
4. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

Примечание: одновременно можно проводить различные исследования при условии совпадения программ амплификации.

4.4. Анализ и интерпретация результатов

4.4.1 Анализ результатов

Качественное и количественное определение ДНК ВПЧ основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct).

При проведении качественного теста амплификация ДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с ПКО-1 и ПКО-2, которые выступают в качестве контрольных точек для оценки эффективности протекания амплификации. По результатам амплификации контрольных точек происходит оценка валидности ПЦР-исследования.

При проведении количественного теста ПКО-1 и ПКО-2 выступают в качестве калибраторов - образцов с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия с известной эффективностью амплификации, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах. Полученное значение концентрации ДНК ВПЧ нормируется на $1 \cdot 10^5$ клеток человека для снижения влияния качества забора биологического материала.

1. Параметры анализа для конкретного прибора указаны в адаптационных методиках.
2. После установления значения пороговой линии необходимо выбрать логарифмическую шкалу для отображения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.
3. Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов (см. адаптационные методики).

4. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно, т.е. контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в адаптационных методиках и паспорте.

В случае несоответствия контрольных точек (ОКЭ, ОКО, ПКО-1, ПКО-2) требуемым значениям – анализ необходимо переделать.

5. Для количественного анализа используются значения концентрации ДНК-мишени в ПКО-1 и ПКО-2 (указаны в паспорте). При использовании ПО к амплификатору, калибровочная прямая строится на основании значения C_t автоматически. При применении открытого ПО для оценки вирусной нагрузки, количественная оценка производится автоматически и данные количественной оценки с прибора не требуются. Подробнее данная процедура описана в адаптационных методиках.

В случае невалидного результата (получение невалидного результата по количеству клеток человека) анализ соответствующего образца необходимо переделать, начиная с этапа экстракции ДНК, либо повторить забор материала.

6. Для расчёта качественных и количественных критериев исследования можно использовать электронный файл или ПО, производства УП «Диасенс». Для его получения обратитесь по e-mail: pcrproduction@diasens.by.

4.4.2 Интерпретация результатов

Расчет концентрации ДНК ВПЧ и количество геномных эквивалентов человека проводится на 1 мл исследуемого образца. Полученные значения используются для расчета количества ДНК ВПЧ, приходящегося на 10^5 клеток человека. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека. Нормирование количества возбудителя на 10^5 клеток человека позволяет оценивать клиническую значимость результата и его валидность. Полученные значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия биологического материала.

Интерпретацию диагностической значимости результатов можно провести вручную, либо в автоматическом режиме.

Ручной расчет нормированных значений концентрации ДНК ВПЧ производят по формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{количество копий ДНК ВПЧ в 1 мл}}{\text{количество копий ДНК человека в 1 мл}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{количество копий ДНК ВПЧ на } 1 \cdot 10^5 \text{ клеток человека})$$

где 2 – это коэффициент пересчета количества копий ДНК человека в количество клеток. Данный расчет рекомендуется проводить автоматически. Подробный алгоритм количественного анализа изложен в адаптационных методиках.

В случае, если расчёт будет производиться при помощи программного обеспечения производства «Диасенс», он может пройти в автоматическом режиме.

5. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ РЕШЕНИЯ

- Недостоверный результат. Результат является недостоверным при отсутствии сигнала по всем каналам детекции, а также при регистрации слабоположительного сигнала по каналам детекции ДНК ВПЧ при отсутствии сигнала по каналу ДНК человека. К появлению недостоверного результата может привести низкий выход или отсутствие нуклеиновых кислот в элюате. Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК, если это возможно, с применением другого метода экстракции.
- Ингибирование ПЦР.
 - Нарушение протокола экстракции ДНК. При нарушении протокола экстракции ДНК в элюате могут находиться ингибиторы ПЦР. Требуется повторно провести исследование начиная с этапа экстракции ДНК.
 - Попадание в ПЦР-смесь посторонних агентов. Попадание в ПЦР-смесь сорбента или магнитных частиц может привести к ингибированию ПЦР. При внесении нуклеиновых кислот необходимо отслеживать попадание сорбента или магнитных частиц в реакционную смесь, при их наличии – удалить / заменить данную реакционную смесь.
- Контаминация специфичной ДНК. Наличие сигнала по любому из каналов в отрицательном контроле свидетельствует о наличии контаминации. Необходимо принять меры по выявлению и устранению источника загрязнения и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Неправильный анализ результатов
 - Некорректная обработка результатов. Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид прямых линий, идущих снизу-вверх. Положительный образец имеет специфическую S-образную кривую накопления флуоресценции. Необходимо отключить учет первых 5 циклов в соответствии с инструкцией прибора. При необходимости данное значение может быть изменено в диапазоне 5–10 циклов.
 - Неправильный подбор уровня пороговой линии. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.
- Некачественный отбор биоматериала. Отсутствие положительного сигнала по каналу детекции человеческого материала при повторном исследовании свидетельствует о некачественном отборе биоматериала. Требуется повторный отбор биоматериала.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

6.1. Срок годности

Срок годности тест-систем составляет 12 месяцев с даты изготовления. После вскрытия тест-системы использовать до истечения срока годности. На результаты полученные с применением тест-системы с истекшим сроком годности гарантии производителя не распространяются.

6.2. Транспортировка

Транспортировка тест-систем осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше 37 °С (до 5 суток) или при температуре от +2 до +8°С (до 30 суток). Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

6.3. Хранение

Тест-системы хранить при температуре от -16 до -24°С в течение всего срока годности. Допускается замораживание/размораживание тест-системы не более 10 раз. Тест-системы после вскрытия хранить в тех же условиях, что и до вскрытия. На результаты полученные с применением тест-системы, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, гарантии производителя не распространяются.

6.4. Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие тест-систем требованиям, изложенным в технической и эксплуатационной документации, при условии соблюдения всех условий транспортирования, хранения и применения в течение указанного срока годности.

Рекламации по качеству реагентов «Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком» направлять в производственное унитарное предприятие «Диагенс»:

E-mail: pcrproduction@diasens.by;

Телефон: +375 17 320-65-10;

Почтовый адрес: 223060, Республика Беларусь, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с, р-н д. Большое Стиклево, S-Union, ячейка 43.

При выявлении нежелательных реакций при использовании тест-систем, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: <http://diasens.by/>.

7. УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Символы опасности
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		

Версия 2023-07-26



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком:

Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14 тип»

комплект Стандарт
комплект Планшет
комплект Пробирки

TU BY 191655593.011-2023

ВНИМАНИЕ!

Изучите инструкцию перед
началом работы



Производственное унитарное предприятие «Диагенс»

Юридический адрес: 223060, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с, район деревни Большое Стиклево, д. 40, корп. 1, пом. 22

Производственная площадка: Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Купревича, 7, помещение № 162, 360

office@diasens.by
+375 17 320-65-10

Каталожный номер: 011/3/**

* - дополнительный символ, для уточнения комплектации

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14-тип»
Стандарт / Планшет / Пробирки

Diasens
ТУ BY 191655593.011-2023

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Назначение	3
1.1.	Функциональные характеристики	3
1.1.1.	Аналитическая специфичность	4
1.1.2.	Аналитическая чувствительность	4
1.1.3.	Лимит детекции	4
1.1.4.	Линейный диапазон измерения	4
1.1.5.	Воспроизводимость и повторяемость измерения	4
1.2.	Контроль качества тест-систем	5
1.3.	Противоконтаминационные меры	5
1.4.	Безопасность реагентов	5
2.	Комплектация	6
2.1.	Комплект Стандарт	6
2.2.	Комплект Планшет	7
2.3.	Комплект Пробирки	7
3.	Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором	8
4.	Методы исследования	8
4.1.	Подготовка образца	8
4.2.	Подготовка реагентов к применению	9
4.2.1.	Комплект Стандарт	9
4.2.2.	Комплект Планшет	10
4.2.3.	Комплект Пробирки	11
4.3.	Программирование прибора	11
4.4.	Анализ и интерпретация результатов	12
4.4.1.	Анализ результатов	12
4.4.2.	Интерпретация результатов	13
5.	Возможные проблемы и их решение	14
6.	Условия хранения и транспортировки	15
6.1.	Срок годности	15
6.2.	Транспортировка	15
6.3.	Хранение	15
6.4.	Гарантии производителя	15
7.	Условные обозначения	16

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Тест-система	тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14-тип»
«Диагенс»	производственное унитарное предприятие «Диагенс»
ВПЧ	вирус папилломы человека
ВКР	высокий канцерогенный риск
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
ГЭ	геномный эквивалент
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ОКЭ	отрицательный контроль экстракции
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция с детекцией результата в режиме реального времени
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
СИЗ	средство индивидуальной защиты
ОСОЧ	объекты среды обитания человека
ПО	программное обеспечение
Ct	Cycle threshold, значение порогового цикла
LoD	Лимит детекции

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «Diasens ВПЧ ВКР-14 тип» предназначена для обнаружения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов высокого канцерогенного риска в биологическом материале: соскоб эпителиальных клеток, соскоб или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса, в том числе в транспортную среду для жидкостной цитологии), соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, прямой кишки. Тест-система предназначена для качественного и количественного исследования методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени в лабораторной клинической практике.

Наборы могут применяться для проведения как медицинских, так и научных исследований. Результат исследования учитывается в комплексной диагностике заболевания с целью подтверждения диагноза и мониторинга лечения.

Материалом для проведения исследований служат образцы ДНК, экстрагированные с помощью наборов реагентов, изготовленных Производственным унитарным предприятием «Диасенс», либо наборов с похожими характеристиками других производителей. Функциональные характеристики валидированы при применении полного комплекта производства УП «Диасенс». В случае необходимости применения реагентов для экстракции других производителей, компания готова оказать содействие в валидации.

Тест-система совместима с амплификаторами планшетного и роторного типа с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. Разработаны Адаптационные методики для применения тест-системы на приборах следующих производителей: «Диасенс» (Беларусь), ООО НПО ДНК-Технология (РФ), Applied Biosystems (США), Corbett Research (Австралия), QIAGEN GmbH (Германия), Bio-Rad Laboratories, Inc (США), Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd (КНР), Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd (КНР), Roche Holding (Швейцария).

При необходимости возможна адаптация протокола для других амплификаторов с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, представленных в лаборатории конечного пользователя набора.

1.1. Функциональные характеристики

- Аналитическая специфичность тест-системы не менее 99,5%.
- Аналитическая чувствительность тест-системы не менее 99%.
- Лимит детекции – $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл (для всех типов ВПЧ).
- Линейный диапазон измерения в пределах от $8 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$.
- Коэффициент вариации при испытаниях воспроизводимости и повторяемости измерений не превышает 5%.

1.1.1 Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности тест-системы проводилась методом тестирования коммерческих стандартов и анализа нуклеотидных последовательностей микроорганизмов и генома человека. Анализ показал отсутствие неспецифической реакции в отношении образцов ДНК человека и ДНК следующих микроорганизмов: *Candida albicans*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus influenzae*, *Leptothrix sp.*, *Mobiluncus sp.*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus pyogenes*, *Trichomonas vaginalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, HSV 1 и 2 типа, CMV, EBV, HHV6, HBV, HIV1,2, HPV (типы 6, 11, 44, 53, 73, 82), VZV, коронавирусов человека.

1.1.2 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выявления ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов составляет не менее 99%. Для оценки использовались коммерческие стандартные образцы и наборы, зарегистрированные в Республике Беларусь.

1.1.3 Лимит детекции

Для выявления диагностически значимого уровня ДНК ВПЧ при учете результатов производится расчет количества ДНК ВПЧ относительно $1 \cdot 10^5$ клеток человека. Лимит детекции для генотипов ВПЧ составляет $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, с учетом достаточного количества клеток человека, что позволяет выявлять вирусную нагрузку от 1 Ig.

Лимит детекции установлен путем анализа серийных разведений коммерческих стандартных образцов.

Лимит детекции зависит от вида биологического материала, используемого способа и реагентов для выделения нуклеиновых кислот, а также конечного объема элюции выделенных нуклеиновых кислот.

1.1.4 Линейный диапазон измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, находится в пределах от $8 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$. Указанные характеристики достигаются при соблюдении условий отбора и пробоподготовки биологического материала.

1.1.5 Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений оценивается по параметру «Коэффициент вариации (CV)», также известному как «Относительное стандартное отклонение». CV показывает степень изменчивости по отношению к среднему показателю выборки.

Оценку воспроизводимости и повторяемости измерений тест-системы «Diasens ВПЧ ВКР-14 тип» проводили путем исследования тест-системой стандартных коммерческих образцов с известной концентрацией от $5 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$ ГЭ/мл. Тестирование каждого разведения для оценки

повторяемости проводилось в 16 повторях, для оценки воспроизводимости – в 32 повторях. По результатам испытаний CV не превышает 5%

1.2. Контроль качества тест-систем

Для оценки валидности этапа амплификации используется эндогенный ВКО, ОКО и положительные контрольные образцы ПКО-1 и ПКО-2. Результаты исследования ВКО и ПКО должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в паспорте тест-системы. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей.

Отрицательный контроль (ОКО) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК ВПЧ. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, и контроля, начиная с этапа ПЦР.

1.3. Противооконтаминационные меры

Лаборатория, в которой будет использоваться тест-система, должна быть оснащена необходимым оборудованием, а весь рабочий процесс, необходимо выполнять поэтапно в разных зонах, не допуская возвращения образцов в предыдущие зоны. Оператор должен использовать СИЗы, своевременно менять одноразовые наконечники дозаторов и соблюдать базовые принципы работы в чистой зоне.

Рекомендуется не реже одного раза в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами.

Оценка загрязнения проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами.

1.4 Безопасность реагентов

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

- Вещества, обладающие потенциальной инфекционной природой, отсутствуют.

2. КОМПЛЕКТАЦИЯ

«Diasens ВПЧ ВКР-14 тип» является универсальным диагностиком, для проведения ПЦР-РВ с ДНК из клинического материала. Тест-система позволяет выявлять, типировать и оценивать количественно ДНК вирусов папилломы человека 14 типов высокого канцерогенного риска (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) в исследуемом материале.

Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Амплификацию можно проводить с использованием открытых приборов для амплификации с детекцией результата изменения флуоресценции в режиме реального времени.

2.1 Комплект Стандарт

«Diasens ВПЧ ВКР-14 тип» комплект Стандарт, рассчитан на проведение 100 исследований, представлен в таблице 2.1.1.

Таблица 2.1.1 «Diasens ВПЧ ВКР-14 тип» комплект Стандарт

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. ПЦР-реагент	4 шт.	0,50 мл
2. Праймеры ВПЧ ВКР-1	1 шт.	0,50 мл
3. Праймеры ВПЧ ВКР-2	1 шт.	0,50 мл
4. Праймеры ВПЧ ВКР-3	1 шт.	0,50 мл
5. Праймеры ВПЧ ВКР-4	1 шт.	0,50 мл
6. ПКО-1	1 шт.	0,50 мл
7. ПКО-2	1 шт.	0,50 мл
8. ОКО	1 шт.	1,0 мл

Данный комплект представляет собой стандартный набор реагентов, который нужно пропорционально смешать согласно протоколу в таблице 4.2.1. Реагенты перед применением требуется тщательно разморозить и встряхнуть на вортексе. После смешивания разнести в пластик совместимый с используемым анализатором. Программа указана в п. 4.3. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках. Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами приведена в таблице 2.1.2.

Таблица 2.1.2 Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (384)	до 200 мкл (384)	два вида (768)
	Без дополнительного расходного материала	011/3/1a	-	-	-
	0,2 ПЦР пробирка/одиночная, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/3/1b	011/3/1ba	011/3/1bb	011/3/1bc
	0,2 ПЦР пробирка/в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/3/1c	011/3/1ca	011/3/1cb	011/3/1cc
	0,1 ПЦР пробирка/в стрипе по 4, из оптически прозрачного пластика, для Rotor-Gene	011/3/1d	011/3/1da	011/3/1db	011/3/1dc
	Планшет высокий профиль, прозрачный	011/3/1e	011/3/1ea	011/3/1eb	011/3/1ec

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (384)	до 200 мкл (384)	два вида (768)
	Планшет высокий профиль, белый	011/3/1f	011/3/1fa	011/3/1fb	011/3/1fc
	Планшет низкий профиль, прозрачный	011/3/1g	011/3/1ga	011/3/1gb	011/3/1gc
	Планшет низкий профиль, белый	011/3/1h	011/3/1ha	011/3/1hb	011/3/1hc

2.2 Комплект Планшет

«Diasens ВПЧ ВКР-14 тип» комплект Планшет, рассчитан на проведение 96 исследований, представлен в таблице 2.2.1.

Таблица 2.2.1 «Diasens ВПЧ ВКР-14 тип» комплект Планшет

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. Планшет с ПЦР смесью в высушенном виде	4 шт.	-
2. ПКО-1	1 шт.	0,50 мл
3. ПКО-2	1 шт.	0,50 мл
4. ОКО	1 шт.	1,0 мл

В данном комплекте реагенты находятся на дне лунок планшета в высушенном виде. Перед использованием необходимо удалить защитную пленку и внести образец в соответствующую лунку. Допускается использование планшетов не полностью, для этого необходимо отделить необходимое количество лунок. Программа указана в п. 4.3. Комплект оптимально подходит для планшетных анализаторов. Совместимость вариантов комплекта Планшет с амплификаторами приведена в таблице 2.2.2.

Таблица 2.2.2 Совместимость вариантов комплекта Планшет с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (384)	до 200 мкл (384)	два вида (768)
	высокий профиль, прозрачный	011/3/2a	011/3/2aa	011/3/2ab	011/3/2ac
	высокий профиль, белый	011/3/2b	011/3/2ba	011/3/2bb	011/3/2bc
	низкий профиль, прозрачный	011/3/2c	011/3/2ca	011/3/2cb	011/3/2cc
	низкий профиль, белый	011/3/2d	011/3/2da	011/3/2db	011/3/2dc

2.3 Комплект Пробирки

«Diasens ВПЧ ВКР-14 тип» комплект Пробирки, рассчитан на проведение 96 исследований, представлен в таблице 2.3.1.

Таблица 2.3.1 «Diasens ВПЧ ВКР-14 тип» комплект Пробирки

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. Пробирки с ПЦР смесью в высушенном виде	384 шт.	-
2. ПКО-1	1 шт.	0,50 мл
3. ПКО-2	1 шт.	0,50 мл
4. ОКО	1 шт.	1,0 мл

В данном комплекте реагенты находятся на дне пробирок в высушенном виде. Перед использованием необходимо внести образец. Программа указана в п. 4.3. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в п. адаптационных методиках. Совместимость вариантов комплекта Пробирки с амплификаторами приведена в таблице 2.3.2.

Таблица 2.3.2 Совместимость вариантов комплекта Пробирки с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт	
		до 20 мкл	до 200 мкл
011/3/3a	0,2 ПЦР пробирка/одиночная или в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	нет	нет
011/3/3b	-/-	да (384)	нет
011/3/3c	-/-	нет	да (384)
011/3/3d	-/-	да (384)	да (384)

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С НАБОРОМ

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
- центрифуга-вортес с функцией центрифугирования и встряхивания;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками или 96 луночные планшеты с оптически прозрачной пленкой – при использовании прибора планшетного типа и комплекта Стандарт;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа и комплекта Стандарт;
- штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов и оборудованием);
- штативы для пробирок объемом 1,5 – 2,0 мл;
- холодильник, поддерживающий температуру от +2 до +8°C, и морозильник, поддерживающий температуру от -16 до -24°C;
- пробирки объемом 1,5 / 2,0 мл при использовании комплекта Стандарт;
- штативы пластиковые для микропробирок объемом 1,5 / 2,0 мл;
- дозаторы полуавтоматические переменного объема (100 – 1000 мкл, 10 – 100 мкл, 5 – 50 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
- средства индивидуальной защиты;
- емкость для сброса наконечников.

4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Подготовка образца

Работу с образцами для исследования до этапа экстракции следует проводить согласно нормам работы с потенциально инфекционным материалом.

Необходимо соблюдать требования к взятию, транспортировке, подготовке и хранению образцов исследуемого материала. Невыполнение данных требований может повлиять на эффективность экстракции НК.

В зависимости от выбранного метода экстракции, а также в случае применения данной тест-системы без этапа экстракции, провести пробоподготовку согласно методическим рекомендациям к набору.

Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

4.2. Подготовка реагентов к применению

Выделение ДНК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией изготовителя реагентов для выделения нуклеиновых кислот.

Внимание! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением исследований.

4.2.1. Комплект Стандарт

1. При работе с данной тест-системой важно учитывать, что для каждого образца ставится 4 отдельные ПЦР реакции с каждым из 4 вариантов праймеров: ВПЧ ВКР-1, ВПЧ ВКР-2, ВПЧ ВКР-3, ВПЧ ВКР-4. Далее идет описание приготовления на примере одной смеси, но при проведении типирования будет 4 реакции для каждого образца и контролей (ПКО-1, ПКО-2, ОКО).
2. Разморозить все реагенты при комнатной температуре, при этом использование нагрева нежелательно. При возможности, избегать попадание прямых солнечных лучей на компонент «Праймеры ВПЧ ВКР» в процессе разморозки.
3. Когда визуально в растворе не наблюдается льда, перемешать компонент переворачивая пробирку или кратковременным встряхиванием на вортексе.
4. Чтобы избежать потерь реагентов от зависания капель на крышке или стенках пробирки необходимо кратковременное центрифугирование от 2 000 об/мин (допустимо выше) не более 30 сек.
5. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 4.2.1 в отдельной чистой пробирке объемом 1,5 – 2,0 мл:

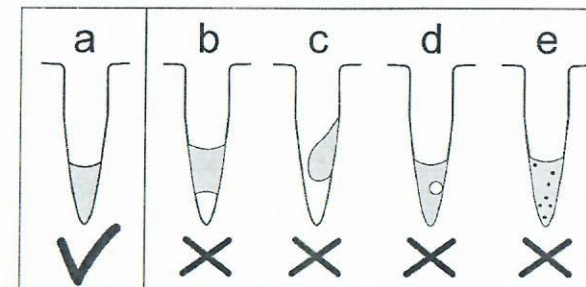
Таблица 4.2.1 Расчет количества реагентов для реакционной смеси

Количество реакций	Количество реагента на реакцию, мкл																		
	1	5	6	8	10	12	16	24	32	36	40	48	56	64	72	80	88	96	100
ПЦР-реагент	5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Праймеры ВПЧ ВКР	5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Итоговый объем смеси	10	50	60	80	100	120	160	240	320	360	400	480	560	640	720	800	880	960	1000

При расчете общего количества каждого компонента нужно учитывать количество реакций, включая исследуемые образцы и контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).

6. Перемешать приготовленную реакционную смесь кратковременным встряхиванием на вортексе не допуская вспенивания, осадить кратковременным центрифугированием.
7. Подготовить пробирки объемом 0,1 – 0,2 мл, совместимые с анализатором, на котором будет проводиться исследование. Разнести реакционную смесь по 10 мкл в пробирки для проведения анализа.
8. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл исследуемых образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке 20 мкл.
9. В пробирки подготовленные для контрольных образцов внести контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).
10. Убедиться, что жидкость в каждой лунке / пробирке находится на дне (рис. 1а) и не содержит пузырьков (рис. 1b и 1d) и/или механических примесей (рис. 1e).

Рисунок 1 – Наглядное положение жидкости в пробирке / лунке.



11. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок / пробирок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
12. Герметично закрыть пробирки крышками/заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой.

4.2.2 Комплект Планшет

1. При работе с данной тест-системой важно учитывать, что для каждого образца ставится 4 отдельные ПЦР реакции в каждом из 4 вариантов планшета: ВПЧ ВКР-1, ВПЧ ВКР-2, ВПЧ ВКР-3 и ВПЧ ВКР-4. Далее идет описание использования на примере одного варианта планшета, но при проведении типирования будет 4 реакции для каждого образца и контролей (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).
2. Снять упаковочную пленку с планшета с ПЦР-смесью. При расчете общего количества нужно учитывать количество реакций, включая исследуемые образцы и контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).

- Используя наконечник с фильтром в подготовленные лунки добавить по **20 мкл** исследуемых и контрольных образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 лунке **20 мкл**.
- Убедитесь, что жидкость в каждой лунке находится на дне (рис. 1а) и не содержит пузырьков (рис. 1б и 1д) и/или механических примесей (рис. 1е).
- В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок — удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц — удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
- Герметично заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой. Не использовать упаковочную пленку!

4.2.3. Комплект Пробирки

- При работе с данной тест-системой важно учитывать, что для каждого образца ставится 4 отдельные ПЦР реакции с каждым из 4 вариантов пробирок: ВПЧ ВКР-1, ВПЧ ВКР-2, ВПЧ ВКР-3, ВПЧ ВКР-4. Далее идет описание использования на примере одного варианта пробирок, но при проведении типирования будет 4 реакции для каждого образца и контролей (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).
- Подготовить необходимое количество пробирок
- Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по **20 мкл** исследуемых и контрольных образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке **20 мкл**.
- Убедитесь, что жидкость в каждой пробирке находится на дне и не содержит пузырьков и/или магнитных частиц (рис. 1).
- В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок — удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц — удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
- Герметично закрыть пробирки крышками.

4.3. Программирование прибора

- Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки /планшеты в амплификатор.
- В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно протоколу амплификации. Обобщенная программа амплификации приведена в таблице 4.3. Программа амплификации зависит от используемого прибора и выбранного варианта комплекта. Более подробная программа амплификации и пошаговое описание настройки прибора для первого запуска приведена в адаптационных методиках. При возникновении необходимости помощи в программировании прибора Вы можете обратиться к производителю (e-mail: pcrproduction@diasens.by, тема: Программирование амплификаторов).

Таблица 4.3 Программа амплификации

№ блока	Тип блока	Шаг	Температура, °C	Время	Детекция	Количество циклов
1	Hold/ Удержание температуры	Начальная денатурация	95	2 мин	—	1
2	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	—	5
		Отжиг	60	15 сек	—	
		Элонгация	67	15 сек	—	
3	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	—	40
		Отжиг	60	15 сек*	+: FAM, HEX**, ROX, Cy5, Cy5.5	
		Элонгация	67	15 сек	—	

* - В случае невозможности задать данное время на приборе, указывается минимальное.

** - Детекция сигнала для флуорофора HEX аналогична флуорофорам R6G, JOE и VIC и может варьироваться.

Ориентировочное время работы прибора 70-90 мин.

- В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

Примечание: одновременно можно проводить различные исследования при условии совпадения программ амплификации.

4.4. Анализ и интерпретация результатов

4.4.1 Анализ результатов

Качественное и количественное определение ДНК ВПЧ основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct).

При проведении качественного теста амплификация ДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с ПКО-1 и ПКО-2, которые выступают в качестве контрольных точек для оценки эффективности протекания амплификации. По результатам амплификации контрольных точек происходит оценка валидности ПЦР-исследования.

При проведении количественного теста ПКО-1 и ПКО-2 выступают в качестве калибраторов - образцов с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия с известной эффективностью амплификации, по которой происходит

определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах. Полученное значение концентрации ДНК ВПЧ нормируется на $1 \cdot 10^5$ клеток человека для снижения влияния качества забора биологического материала.

1. Параметры анализа для конкретного прибора указаны в адаптационных методиках.
2. После установления значения пороговой линии необходимо выбрать логарифмическую шкалу для отображения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.
3. Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Сt» в соответствующей графе в таблице результатов (см. адаптационные методики).
4. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно, т.е. контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в адаптационных методиках и паспорте.

В случае несоответствия контрольных точек (ОКЭ, ОКО, ПКО-1, ПКО-2) требуемым значениям – анализ необходимо переделать.

5. Для количественного анализа используются значения концентрации ДНК-мишени в ПКО-1 и ПКО-2 (указаны в паспорте). При использовании ПО к амплификатору, калибровочная прямая строится на основании значения Сt автоматически. При применении открытого ПО для оценки вирусной нагрузки, количественная оценка производится автоматически и данные количественной оценки с прибора не требуются. Подробнее данная процедура описана в адаптационных методиках.

В случае невалидного результата (получение невалидного результата по количеству клеток человека) анализ соответствующего образца необходимо переделать, начиная с этапа экстракции ДНК, либо повторить забор материала.

6. Для расчёта качественных и количественных критериев исследования можно использовать электронный файл или ПО, производства УП «Диасенс». Для его получения обратитесь по e-mail: pcrproduction@diasens.by

4.4.2 Интерпретация результатов

Расчет концентрации ДНК ВПЧ и количество геномных эквивалентов человека проводится на 1 мл исследуемого образца. Полученные значения используются для расчета количества ДНК ВПЧ, приходящегося на 10^5 клеток человека. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека. Нормирование количества возбудителя на 10^5 клеток человека позволяет оценивать клиническую значимость результата и его валидность. Полученные значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия биологического материала.

Интерпретацию диагностической значимости результатов можно провести вручную, либо в автоматическом режиме.

Ручной расчёт нормированных значений концентрации ДНК ВПЧ производят по формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{количество копий ДНК ВПЧ в 1 мл}}{\text{количество копий ДНК человека в 1 мл}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{количество копий ДНК ВПЧ на } 10^5 \text{ клеток человека})$$

где 2 – это коэффициент пересчета количества копий ДНК человека в количество клеток. Данный расчет рекомендуется проводить автоматически. Подробный алгоритм количественного анализа изложен в адаптационных методиках.

В случае, если расчёт будет производиться при помощи программного обеспечения производства «Диасенс», он может пройти в автоматическом режиме.

5. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ РЕШЕНИЕ

- Недостоверный результат. Результат является недостоверным при отсутствии сигнала по всем каналам детекции, а также при регистрации слабоположительного сигнала по каналам детекции ДНК ВПЧ при отсутствии сигнала по каналу ДНК человека. К появлению недостоверного результата может привести низкий выход или отсутствие нуклеиновых кислот в элюате. Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК, если это возможно, с применением другого метода экстракции.
- Ингибирование ПЦР.
 - Нарушение протокола экстракции ДНК. При нарушении протокола экстракции ДНК в элюате могут находиться ингибиторы ПЦР. Требуется повторно провести исследование начиная с этапа экстракции ДНК.
 - Попадание в ПЦР-смесь посторонних агентов. Попадание в ПЦР-смесь сорбента или магнитных частиц может привести к ингибированию ПЦР. При внесении нуклеиновых кислот необходимо отслеживать попадание сорбента или магнитных частиц в реакционную смесь, при их наличии – удалить / заменить данную реакционную смесь.
- Контаминация специфичной ДНК. Наличие сигнала по любому из каналов в отрицательном контроле свидетельствует о наличии контаминации. Необходимо принять меры по выявлению и устранению источника загрязнения и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Неправильный анализ результатов
 - Некорректная обработка результатов. Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид прямых линий, идущих снизу-вверх. Положительный образец имеет специфическую S-образную кривую накопления флуоресценции. Необходимо отключить учет первых 5 циклов в соответствии с инструкцией прибора. При необходимости данное значение может быть изменено в диапазоне 5–10 циклов.
 - Неправильный подбор уровня пороговой линии. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно

прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.

- Некачественный отбор биоматериала. Отсутствие положительного сигнала по каналу детекции человеческого материала при повторном исследовании свидетельствует о некачественном отборе биоматериала. Требуется повторный отбор биоматериала.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

6.1. Срок годности

Срок годности тест-систем составляет 12 месяцев с даты изготовления. После вскрытия тест-системы использовать до истечения срока годности. На результаты полученные с применением тест-системы с истекшим сроком годности гарантии производителя не распространяются.

6.2. Транспортировка

Транспортировка тест-систем осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше 37 °С (до 5 суток) или при температуре от +2 до +8°С (до 30 суток). Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

6.3. Хранение

Тест-системы хранить при температуре от -16 до -24°С в течение всего срока годности. Допускается замораживание/размораживание тест-системы не более 10 раз. Тест-системы после вскрытия хранить в тех же условиях, что и до вскрытия. На результаты полученные с применением тест-системы, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, гарантии производителя не распространяются.

6.4. Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие тест-систем требованиям, изложенным в технической и эксплуатационной документации, при условии соблюдения всех условий транспортирования, хранения и применения в течение указанного срока годности.

Рекламации по качеству реагентов «Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком» направлять в производственное унитарное предприятие «Диасенс»:

E-mail: perproduction@diasens.by;

Телефон: +375 17 320-65-10;

Почтовый адрес: 223060, Республика Беларусь, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с, р-н д. Большое Стиклево, S-Union, ячейка 43.

При выявлении нежелательных реакций при использовании тест-систем, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: <http://diasens.by/>.

7. УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Символы опасности
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		

Версия 2023-07-26



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком:

Тест-система «Diasens ВПЧ НКР»

комплект Стандарт
комплект Планшет
комплект Пробырки

ТУ ВУ 191655593.011-2023

ВНИМАНИЕ!

Изучите инструкцию перед
началом работы



Производственное унитарное предприятие «Диасенс»

Юридический адрес: 223060, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с,
район деревни Большое Стиклево, д. 40, корп. 1, пом. 22

Производственная площадка: Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Купревича, 7,
помещение № 162, 360

office@diasens.by
+375 17 320-65-10

Каталожный номер: 011/4/**

* – дополнительный символ, для уточнения комплектации

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-система «Diasens ВПЧ НКР»
Стандарт / Планшет / Пробырки

Diasens
ТУ ВУ 191655593.011-2023

СОДЕРЖАНИЕ

1	Назначение.....	3
1.1	Функциональные характеристики.....	3
1.1.1	Аналитическая специфичность.....	3
1.1.2	Аналитическая чувствительность.....	4
1.1.3	Лимит детекции.....	4
1.1.4	Линейный диапазон измерения.....	4
1.1.5	Воспроизводимость и повторяемость измерения.....	4
1.2	Контроль качества тест-систем.....	5
1.3	Противоконтаминационные меры.....	5
1.4	Безопасность реагентов.....	5
2	Комплектация.....	5
2.1	Комплект Стандарт.....	6
2.2	Комплект Планшет.....	7
2.3	Комплект Пробырки.....	7
3	Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором.....	8
4	Методы исследования.....	8
4.1	Подготовка образца.....	8
4.2	Подготовка реагентов к применению.....	9
4.2.1	Комплект Стандарт.....	9
4.2.2	Комплект Планшет.....	10
4.2.3	Комплект Пробырки.....	10
4.3	Программирование прибора.....	11
4.4	Анализ и интерпретация результатов.....	12
4.4.1	Анализ результатов.....	12
4.4.2	Интерпретация результатов.....	13
5	Возможные проблемы и их решение.....	13
6	Условия хранения и транспортировки.....	15
6.1	Срок годности.....	15
6.2	Транспортировка.....	15
6.3	Хранение.....	15
6.4	Гарантии производителя.....	15
7	Условные обозначения.....	16

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Тест-система	тест-система «Diasens ВПЧ НКР»
«Диасенс»	производственное унитарное предприятие «Диасенс»
ВПЧ	вирус папилломы человека
НКР	низкий канцерогенный риск
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
ГЭ	геномный эквивалент
ВКО	внутренний контрольный образец
ОКО	отрицательный контрольный образец
ОКЭ	отрицательный контроль экстракции
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция с детекцией результата в режиме реального времени
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
СИЗ	средство индивидуальной защиты
ОСОЧ	объекты среды обитания человека
ПО	программное обеспечение
Сt	Cycle threshold, значение порогового цикла
LoD	Лимит детекции

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «Diasens ВПЧ НКР» предназначена для обнаружения ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 типов низкого канцерогенного риска в биологическом материале: соскоб эпителиальных клеток, соскоб или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта, мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (эктоцервикса и эндоцервикса, в том числе в транспортную среду для жидкостной цитологии), соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, прямой кишки. Тест-система предназначена для качественного и количественного исследования методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени в лабораторной клинической практике.

Наборы могут применяться для проведения как медицинских, так и научных исследований. Результат исследования учитывается в комплексной диагностике заболевания с целью подтверждения диагноза и мониторинга лечения.

Материалом для проведения исследований служат образцы ДНК, экстрагированные с помощью наборов реагентов, изготовленных Производственным унитарным предприятием «Диасенс», либо наборов с похожими характеристиками других производителей. Функциональные характеристики валидированы при применении полного комплекта производства «Диасенс». В случае необходимости применения реагентов для экстракции других производителей, компания готова оказать содействие в валидации.

Тест-система совместима с амплификаторами планшетного и роторного типа с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. Разработаны Адаптационные методики для применения тест-системы на приборах следующих производителей: «Диасенс» (Беларусь), ООО НПО ДНК-Технология (РФ), Applied Biosystems (США), Corbett Research (Австралия), QIAGEN GmbH (Германия), Bio-Rad Laboratories, Inc (США), Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd (КНР), Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd (КНР), Roche Holding (Швейцария).

При необходимости возможна адаптация протокола для других амплификаторов с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, представленных в лаборатории конечного пользователя набора.

1.1. Функциональные характеристики

- Аналитическая специфичность тест-системы не менее 99,5%.
- Аналитическая чувствительность тест-системы не менее 99%.
- Лимит детекции – $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл (для всех типов ВПЧ).
- Линейный диапазон измерения в пределах от $8 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$.
- Коэффициент вариации при испытаниях воспроизводимости и повторяемости измерений не превышает 5%.

1.1.1 Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности тест-системы проводилась методом тестирования коммерческих стандартов и анализа нуклеотидных последовательностей микроорганизмов и генома человека. Анализ показал отсутствие неспецифической реакции в отношении образцов ДНК

человека и ДНК следующих микроорганизмов: *Candida albicans*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus influenzae*, *Leptothrix* sp., *Mobiluncus* sp., *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*), *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus pyogenes*, *Trichomonas vaginalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, HSV 1 и 2 типа, CMV, EBV, HHV6, HBV, HIV1,2, HPV (типы 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), VZV, коронавирусов человека.

1.1.2 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выявления ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 типов составляет не менее 99%. Для оценки использовались коммерческие стандартные образцы и наборы, зарегистрированные в Республике Беларусь.

1.1.3 Лимит детекции

Для выявления диагностически значимого уровня ДНК ВПЧ при учете результатов производится расчет количества ДНК ВПЧ относительно $1 \cdot 10^5$ клеток человека. Лимит детекции для генотипов ВПЧ составляет $5 \cdot 10^3$ ГЭ/мл, с учетом достаточного количества клеток человека, что позволяет выявлять вирусную нагрузку от 1 Ig.

Лимит детекции установлен путем анализа серийных разведений коммерческих стандартных образцов.

Лимит детекции зависит от вида биологического материала, используемого способа и реагентов для выделения нуклеиновых кислот, а также конечного объема элюции выделенных нуклеиновых кислот.

1.1.4 Линейный диапазон измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, находится в пределах от $8 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$. Указанные характеристики достигаются при соблюдении условий отбора и пробоподготовки биологического материала.

1.1.5 Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений оценивается по параметру «Коэффициент вариации (CV)», также известному как «Относительное стандартное отклонение». CV показывает степень изменчивости по отношению к среднему показателю выборки.

Оценку воспроизводимости и повторяемости измерений тест-системы «Diasens ВПЧ НКР» проводили путем исследования тест-системой стандартных коммерческих образцов с известной концентрацией от $5 \cdot 10^3$ до $3 \cdot 10^8$ ГЭ/мл. Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 16 повторах, для оценки воспроизводимости – в 32 повторах. По результатам испытаний CV не превышает 5%

1.2. Контроль качества тест-систем

Для оценки валидности этапа амплификации используется эндогенный ВКО, ОКО и положительные контрольные образцы ПКО-1 и ПКО-2. Результаты исследования ВКО и ПКО должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в паспорте тест-системы. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей.

Отрицательный контроль (ОКО) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК ВПЧ. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена ДНК ВПЧ, и контроля, начиная с этапа ПЦР.

1.3. Противоконтаминационные меры

Лаборатория, в которой будет использоваться тест-система, должна быть оснащена необходимым оборудованием, а весь рабочий процесс, необходимо выполнять поэтапно в разных зонах, не допуская возвращения образцов в предыдущие зоны. Оператор должен использовать СИЗы, своевременно менять одноразовые наконечники дозаторов и соблюдать базовые принципы работы в чистой зоне.

Рекомендуется не реже одного раза в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами.

Оценка загрязнения проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами.

1.4 Безопасность реагентов

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.
- Вещества, обладающие потенциальной инфекционной природой, отсутствуют.

2. КОМПЛЕКТАЦИЯ

«Diasens ВПЧ НКР» является универсальным диагностиком, для проведения ПЦР-РВ с ДНК из клинического материала. Тест-система позволяет выявлять и оценивать количественно ДНК вирусов папилломы человека 6 и 11 типов низкого канцерогенного риска с дифференциацией 6 и 11 типов в исследуемом материале.

Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Амплификацию можно проводить с использованием открытых приборов для амплификации с детекцией результата изменения флуоресценции в режиме реального времени.

2.1 Комплект Стандарт

«Diasens ВПЧ НКР» комплект Стандарт, рассчитан на проведение 100 исследований, представлен в таблице 2.1.1.

Таблица 2.1.1 «Diasens ВПЧ НКР» комплект Стандарт

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. ПЦР-реагент	1 шт.	0,50 мл
2. Праймеры ВПЧ НКР	1 шт.	0,50 мл
3. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
4. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
5. ОКО	1 шт.	0,50 мл

Данный комплект представляет собой стандартный набор реагентов, который нужно пропорционально смешать согласно протоколу в таблице 4.2.1. Реагенты перед применением требуется тщательно разморозить и встряхнуть на вортексе. После смешивания разнести в пластик совместимый с используемым анализатором. Программа указана в п. 4.2. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках. Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами приведена в таблице 2.1.2.

Таблица 2.1.2 Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (96)	до 200 мкл (96)	два вида (192)
	Без дополнительного расходного материала	011/4/1a	-	-	-
	0,2 ПЦР пробирка/одиночная, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/4/1b	011/4/1ba	011/4/1bb	011/4/1bc
	0,2 ПЦР пробирка/в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/4/1c	011/4/1ca	011/4/1cb	011/4/1cc
	0,1 ПЦР пробирка/в стрипе по 4, из оптически прозрачного пластика, для Rotor-Gene	011/4/1d	011/4/1da	011/4/1db	011/4/1dc
	Планшет высокий профиль, прозрачный	011/4/1e	011/4/1ea	011/4/1eb	011/4/1ec
	Планшет высокий профиль, белый	011/4/1f	011/4/1fa	011/4/1fb	011/4/1fc
	Планшет низкий профиль, прозрачный	011/4/1g	011/4/1ga	011/4/1gb	011/4/1gc
	Планшет низкий профиль, белый	011/4/1h	011/4/1ha	011/4/1hb	011/4/1hc

2.2 Комплект Планшет

«Diasens ВПЧ НКР» комплект Планшет, рассчитан на проведение 96 исследований, представлен в таблице 2.2.1.

Таблица 2.2.1 «Diasens ВПЧ НКР» комплект Планшет

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. Планшет с ПЦР смесью в высушенном виде	1 шт.	-
2. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
3. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
4. ОКО	1 шт.	0,50 мл

В данном комплекте реагенты находятся на дне лунок планшета в высушенном виде. Перед использованием необходимо удалить защитную пленку и внести образец в соответствующую лунку. Допускается использование планшетов не полностью, для этого необходимо отделить необходимое количество лунок. Программа указана в п. 4.2. Комплект оптимально подходит для планшетных анализаторов. Совместимость вариантов комплекта Планшет с амплификаторами приведена в таблице 2.2.2.

Таблица 2.2.2 Совместимость вариантов комплекта Планшет с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (96)	до 200 мкл (96)	два вида (192)
	высокий профиль, прозрачный	011/4/2a	011/4/2aa	011/4/2ab	011/4/2ac
	высокий профиль, белый	011/4/2b	011/4/2ba	011/4/2bb	011/4/2bc
	низкий профиль, прозрачный	011/4/2c	011/4/2ca	011/4/2cb	011/4/2cc
	низкий профиль, белый	011/4/2d	011/4/2da	011/4/2db	011/4/2dc

2.3 Комплект Пробирки

«Diasens ВПЧ НКР» комплект Пробирки, рассчитан на проведение 96 исследований, представлен в таблице 2.3.1.

Таблица 2.3.1 «Diasens ВПЧ НКР» комплект Пробирки

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. Пробирки с ПЦР смесью в высушенном виде	96 шт.	-
2. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
3. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
4. ОКО	1 шт.	0,50 мл

В данном комплекте реагенты находятся на дне пробирок в высушенном виде. Перед использованием необходимо внести образец. Программа указана в п. 4.3. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках. Совместимость вариантов комплекта Пробирки с амплификаторами приведена в таблице 2.3.2.

Таблица 2.3.2 Совместимость вариантов комплекта Пробирки с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт	
		до 20 мкл	до 200 мкл
011/4/3a	0,2 ПЦР пробирка/одиночная или в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	нет	нет
011/4/3b	-/-	да (96)	нет
011/4/3c	-/-	нет	да (96)
011/4/3d	-/-	да (96)	да (96)

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С НАБОРОМ

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
- центрифуга-вортекс с функцией центрифугирования и встряхивания;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками или 96 луночные планшеты с оптически прозрачной пленкой – при использовании прибора планшетного типа и комплекта Стандарт;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа и комплекта Стандарт;
- штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов и оборудованием);
- штативы для пробирок объемом 1,5 – 2,0 мл;
- холодильник, поддерживающий температуру от +2 до +8°C, и морозильник, поддерживающий температуру от -16 до -24°C;
- пробирки объемом 1,5 / 2,0 мл при использовании комплекта Стандарт;
- штативы пластиковые для микропробирок объемом 1,5 / 2,0 мл;
- дозаторы полуавтоматические переменного объема (100 – 1000 мкл, 10 – 100 мкл, 5 – 50 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
- средства индивидуальной защиты;
- емкость для сброса наконечников.

4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Подготовка образца

Работу с образцами для исследования до этапа экстракции следует проводить согласно нормам работы с потенциально инфекционным материалом.

Необходимо соблюдать требования к взятию, транспортировке, подготовке и хранению образцов исследуемого материала. Невыполнение данных требований может повлиять на эффективность экстракции НК.

В зависимости от выбранного метода экстракции, а также в случае применения данной тест-системы без этапа экстракции, провести пробоподготовку согласно методическим рекомендациям к набору.

Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинично-диагностической лаборатории. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их

учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

4.2. Подготовка реагентов к применению

Выделение ДНК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией изготовителя реагентов для выделения нуклеиновых кислот.

Внимание! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением исследований.

4.2.1. Комплект Стандарт

- Разморозить все реагенты при комнатной температуре, при этом использование нагрева нежелательно. При возможности, избегать попадание прямых солнечных лучей на компонент «Праймеры ВПЧ НКР» в процессе разморозки.
- Когда визуально в растворе не наблюдается льда, перемешать компонент переворачивая пробирку или кратковременным встряхиванием на вортексе.
- Чтобы избежать потерь реагентов от зависания капель на крышке или стенках пробирки необходимо кратковременное центрифугирование от 2 000 об/мин (допустимо выше) не более 30 сек.
- Приготовить реакционную смесь согласно таблице 4.2.1 в отдельной чистой пробирке объемом 1,5 – 2,0 мл:

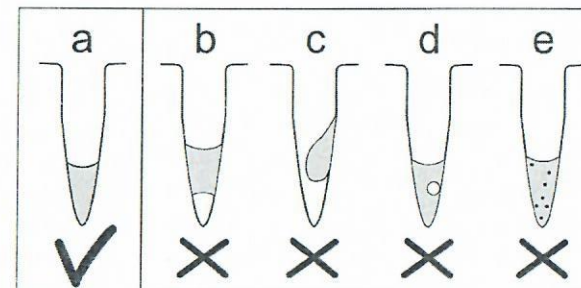
Таблица 4.2.1 Расчет количества реагентов для реакционной смеси

Количество реагента на реакцию, мкл																			
Реагент	Количество реакций																		
		1	5	6	8	10	12	16	24	32	36	40	48	56	64	72	80	88	96
ПЦР-реагент	5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Праймеры ВПЧ НКР	5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Итоговый объем смеси	10	50	60	80	100	120	160	240	320	360	400	480	560	640	720	800	880	960	1000

При расчёте общего количества каждого компонента нужно учитывать количество реакций, включая исследуемые образцы и контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).

- Перемешать приготовленную реакционную смесь кратковременным встряхиванием на вортексе не допуская вспенивания, осадить кратковременным центрифугированием.
- Подготовить пробирки объемом 0,1 – 0,2 мл, совместимые с анализатором, на котором будет проводиться исследование. Разнести реакционную смесь по 10 мкл в пробирки для проведения анализа.
- Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл исследуемых образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке 20 мкл.
- В пробирки подготовленные для контрольных образцов внести контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).
- Убедитесь, что жидкость в каждой лунке / пробирке находится на дне (рис. 1а) и не содержит пузырьков (рис. 1b и 1d) и/или механических примесей (рис. 1e).

Рисунок 1 – Наглядное положение жидкости в пробирке / лунке.



- В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок / пробирок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
- Герметично закрыть пробирки крышками/заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой.

4.2.2 Комплект Планшет

- Снять упаковочную пленку с планшета с ПЦР-смесью.
- Используя наконечник с фильтром в подготовленные лунки добавить по 20 мкл исследуемых и контрольных образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 лунке 20 мкл.
- Убедитесь, что жидкость в каждой лунке находится на дне (рис. 1а) и не содержит пузырьков (рис. 1b и 1d) и/или механических примесей (рис. 1e).
- В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
- Герметично заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой. Не использовать упаковочную пленку!

4.2.3. Комплект Пробирки

- Подготовить необходимое количество пробирок/ При расчёте общего количества нужно учитывать количество реакций, включая исследуемые образцы и контроли (ПКО-1, ПКО-2, ОКО, ОКЭ).
- Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 20 мкл исследуемых и контрольных образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке 20 мкл.
- Убедитесь, что жидкость в каждой пробирке находится на дне (рис. 1а) и не содержит пузырьков (рис. 1b и 1d) и/или механических примесей (рис. 1e).

- В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
- Герметично закрыть пробирки крышками.

4.3. Программирование прибора

- Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки /планшеты в амплификатор.
- В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно протоколу амплификации. Обобщенная программа амплификации приведена в таблице 4.3. Программа амплификации зависит от используемого прибора и выбранного варианта комплекта. Более подробная программа амплификации и пошаговое описание настройки прибора для первого запуска приведена в адаптационных методиках. При возникновении необходимости помощи в программировании прибора Вы можете обратиться к производителю (e-mail: pcrproduction@diasens.by, тема: Программирование амплификаторов).

Табл. 4.3 Программа амплификации

№ блока	Тип блока	Шаг	Температура, °C	Время	Детекция	Количество циклов
1	Hold/ Удержание температуры	Начальная денатурация	95	2 мин	–	1
2	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	–	5
		Отжиг	60	15 сек	–	
		Элонгация	67	15 сек	–	
3	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	–	40
		Отжиг	60	15 сек*	+: FAM, HEX**, ROX	
		Элонгация	67	15 сек	–	

* - В случае невозможности задать данное время на приборе, указывается минимальное.

** - Детекция сигнала для флуорофора HEX аналогична флуорофорам R6G, JOE и VIC и может варьироваться.

Ориентировочное время работы прибора 70-90 мин.

- В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.
- Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

Примечание: одновременно можно проводить различные исследования при условии совпадения программ амплификации.

4.4. Анализ и интерпретация результатов

4.4.1 Анализ результатов

Качественное и количественное определение ДНК ВПЧ основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией ДНК-мишени в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct).

При проведении качественного теста амплификация ДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с ПКО-1 и ПКО-2, которые выступают в качестве контрольных точек для оценки эффективности протекания амплификации. По результатам амплификации контрольных точек происходит оценка валидности ПЦР-исследования.

При проведении количественного теста ПКО-1 и ПКО-2 выступают в качестве калибраторов - образцов с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия с известной эффективностью амплификации, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах. Полученное значение концентрации ДНК ВПЧ нормируется на 1×10^5 клеток человека для снижения влияния качества забора биологического материала.

- Параметры анализа для конкретного прибора указаны в адаптационных методиках.
- После установления значения пороговой линии необходимо выбрать логарифмическую шкалу для отображения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.
- Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов (см. адаптационные методики).
- Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно, т.е. контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в адаптационных методиках и паспорте.

В случае несоответствия контрольных точек (ОКЭ, ОКО, ПКО-1, ПКО-2) требуемым значениям – анализ необходимо переделать.

- Для количественного анализа используются значения концентрации ДНК-мишени в ПКО-1 и ПКО-2 (указаны в паспорте). При использовании ПО к амплификатору, калибровочная прямая строится на основании значения Ct автоматически. При применении открытого ПО для оценки вирусной нагрузки, количественная оценка производится автоматически и данные количественной оценки с прибора не требуются. Подробнее данная процедура описана в адаптационных методиках.

В случае невалидного результата (получение невалидного результата по количеству клеток

человека) анализ соответствующего образца необходимо переделать, начиная с этапа экстракции ДНК, либо повторить забор материала.

6. Для расчёта качественных и количественных критериев исследования можно использовать электронный файл или ПО, производства УП «Диасенс». Для его получения обратитесь по e-mail: pcrproduction@diasens.by

4.4.2 Интерпретация результатов

Расчет концентрации ДНК ВПЧ и количество геномных эквивалентов человека проводится на 1 мл исследуемого образца. Полученные значения используются для расчета количества ДНК ВПЧ, приходящегося на 10^5 клеток человека. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека. Нормирование количества возбудителя на 10^5 клеток человека позволяет оценивать клиническую значимость результата и его валидность. Полученные значения концентраций ДНК человека отражают качество взятия биологического материала.

Интерпретацию диагностической значимости результатов можно провести вручную, либо в автоматическом режиме.

Ручной расчет нормированных значений концентрации ДНК ВПЧ производят по формуле:

$$\lg \left(\frac{\text{количество копий ДНК ВПЧ в 1 мл}}{\text{количество копий ДНК человека в 1 мл}} \cdot 2 \cdot 10^5 \right) = \lg (\text{количество копий ДНК ВПЧ на } 10^5 \text{ клеток человека})$$

где 2 – это коэффициент пересчета количества копий ДНК человека в количество клеток. Данный расчет рекомендуется проводить автоматически. Подробный алгоритм количественного анализа изложен в адаптационных методиках.

В случае, если расчёт будет производиться при помощи программного обеспечения производства «Диасенс», он может пройти в автоматическом режиме.

5. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ РЕШЕНИЕ

- Недостоверный результат. Результат является недостоверным при отсутствии сигнала по всем каналам детекции, а также при регистрации слабоположительного сигнала по каналам детекции ДНК ВПЧ при отсутствии сигнала по каналу ДНК человека. К появлению недостоверного результата может привести низкий выход или отсутствие нуклеиновых кислот в элюате. Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК, если это возможно, с применением другого метода экстракции.
- Ингибирование ПЦР.
 - Нарушение протокола экстракции ДНК. При нарушении протокола экстракции ДНК в элюате могут находиться ингибиторы ПЦР. Требуется повторно провести исследование начиная с этапа экстракции ДНК.

- Попадание в ПЦР-смесь посторонних агентов. Попадание в ПЦР-смесь сорбента или магнитных частиц может привести к ингибированию ПЦР. При внесении нуклеиновых кислот необходимо отслеживать попадание сорбента или магнитных частиц в реакционную смесь, при их наличии – удалить / заменить данную реакционную смесь.
- Контаминация специфичной ДНК. Наличие сигнала по любому из каналов в отрицательном контроле свидетельствует о наличии контаминации. Необходимо принять меры по выявлению и устранению источника загрязнения и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК.
- Неправильный анализ результатов
 - Некорректная обработка результатов. Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид прямых линий, идущих снизу-вверх. Положительный образец имеет специфическую S-образную кривую накопления флуоресценции. Необходимо отключить учет первых 5 циклов в соответствии с инструкцией прибора. При необходимости данное значение может быть изменено в диапазоне 5–10 циклов.
 - Неправильный подбор уровня пороговой линии. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.
- Некачественный отбор биоматериала. Отсутствие положительного сигнала по каналу детекции человеческого материала при повторном исследовании свидетельствует о некачественном отборе биоматериала. Требуется повторный отбор биоматериала.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

6.1. Срок годности

Срок годности тест-систем составляет 12 месяцев с даты изготовления. После вскрытия тест-системы использовать до истечения срока годности. На результаты полученные с применением тест-систем с истекшим сроком годности гарантии производителя не распространяются.

6.2. Транспортировка

Транспортировка тест-систем осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше 37 °С (до 5 суток) или при температуре от +2 до +8°С (до 30 суток). Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

6.3. Хранение

Тест-системы хранить при температуре от -16 до -24°С в течение всего срока годности. Допускается замораживание/размораживание тест-системы не более 10 раз. Тест-системы после вскрытия хранить в тех же условиях, что и до вскрытия. На результаты полученные с применением тест-системы, хранившейся с нарушением указанного режима хранения, гарантии производителя не распространяются.

6.4. Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие тест-систем требованиям, изложенным в технической и эксплуатационной документации, при условии соблюдения всех условий транспортирования, хранения и применения в течение указанного срока годности.

Рекламации по качеству реагентов «Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком» направлять в производственное унитарное предприятие «Диасенс»:

E-mail: pcrproduction@diasens.by;

Телефон: +375 17 320-65-10;

Почтовый адрес: 223060, Республика Беларусь, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с, р-н д. Большое Стиклево, S-Union, ячейка 43.

При выявлении нежелательных реакций при использовании тест-систем, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: <http://diasens.by/>.

7. УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Символы опасности
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		

Версия 2023-07-26

УТВЕРЖДАЮ

Директор
Производственного унитарного
предприятия «Диасенс»

Д.В. Ягодинский

« 26 » июля 2023 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Тест-системы для выявления факторов ассоциированных с раком:

Тест-система «Diasens мРНК гена bcr»

комплект Стандарт

комплект Планшет

комплект Пробирки

ТУ BY 191655593.011-2023

ВНИМАНИЕ!

Изучите инструкцию перед
началом работы



Производственное унитарное предприятие «Диасенс»

Юридический адрес: 223060, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с,
район деревни Большое Стиклево, д. 40, корп. 1, пом. 22

Производственная площадка: Республика Беларусь, 220141, г. Минск, ул. Купревича, 7,
помещение № 162, 360

office@diasens.by
+375 17 320-65-10

Каталожный номер: 011/5/**

* – дополнительный символ, для уточнения комплектации

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-система «Diasens мРНК гена bcr»
Стандарт / Планшет / Пробирки

Diasens
ТУ BY 191655593.011-2023

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Назначение	2
1.1.	Функциональные характеристики	3
1.2.	Контроль качества тест-систем	3
1.3.	Противоконтаминационные меры	4
1.4.	Безопасность реагентов	4
2.	Комплектация	4
2.1.	Комплект Стандарт	5
2.2.	Комплект Планшет	5
2.3.	Комплект Пробирки	6
3.	Оборудование и материалы, необходимые для работы с набором	7
4.	Методы исследования	7
4.1.	Подготовка образца	7
4.2.	Подготовка реагентов к применению	8
4.2.1.	Комплект Стандарт	8
4.2.2.	Комплект Планшет	9
4.2.3.	Комплект Пробирки	9
4.3.	Программирование прибора	10
4.4.	Анализ и интерпретация результатов	11
5.	Возможные проблемы и их решение	11
6.	Условия хранения и транспортировки	12
6.1.	Срок годности	12
6.2.	Транспортировка	12
6.3.	Хранение	13
6.4.	Гарантии производителя	13
7.	Условные обозначения	13

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Тест-система – тест-система «Diasens мРНК гена bcr»

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

«Диасенс» - производственное унитарное предприятие «Диасенс»

ВКО – внутренний контрольный образец

ОКО – отрицательный контрольный образец

ПКО – положительный контрольный образец

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией результата в режиме реального времени

ОТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ОСОЧ – объекты среды обитания человека

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «Diasens мРНК гена bcr» предназначена для обнаружения мРНК мутантного химерного гена bcr-abl, соответствующего двум изоформам белка: p190 и p210, соответствующих участку слияния b2a2, b3a2, c1a3. В качестве гена нормализатора, а также эндогенного внутреннего контроля, используются фрагменты мРНК гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD-S) и области сплайсинга гена abl (согласно рекомендаций «Europe Against Cancer», EAC). Тест-система предназначена для качественного и количественного исследования методом полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции в одной пробирке с гибридационно-флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени в лабораторной клинической практике.

Тест-системы могут применяться для проведения скрининга случаев хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) и острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), ассоциированного с хромосомной перестройкой M-bcr-abl, а также, для мониторинга эффективности терапии, как в медицинских, так и в научных исследованиях. Результат исследования учитывается в комплексной диагностике заболевания с целью подтверждения диагноза и мониторинга лечения.

Материалом для проведения исследований служат образцы РНК, экстрагированные с помощью наборов реагентов, изготовленных Производственным унитарным предприятием «Диасенс», либо наборов с похожими характеристиками других производителей. Функциональные характеристики валидированы при применении полного комплекта производства «Диасенс». В случае необходимости применения реагентов для экстракции других производителей, компания готова оказать содействие в валидации.

Тест-система совместима с амплификаторами планшетного и роторного типа с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени. Разработаны Адаптационные методики для применения тест-системы на приборах следующих производителей: Производственное унитарное предприятие Диасенс (Беларусь), ООО НПО ДНК-Технология (РФ), Applied Biosystems (США), Corbett Research (Австралия), QIAGEN GmbH (Германия), Bio-Rad Laboratories, Inc (США), Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd (КНР), Xi'an Tianlong Science and Technology Co., Ltd (КНР), Roche Holding (Швейцария).

При необходимости возможна адаптация протокола для других амплификаторов с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, представленных в лаборатории конечного пользователя набора.

1.1. Функциональные характеристики

- Аналитическая специфичность тест-системы не менее 99,5%.
- Аналитическая чувствительность тест-системы не менее 99%.

1.2. Контроль качества тест-систем

Для оценки валидности этапа амплификации используется эндогенный ВКО, ОКО и положительные контрольные образцы ПКО-1 и ПКО-2. Результаты исследования ВКО и ПКО должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в паспорте тест-системы. В случае несоответствия результатов для положительных контролей заданным критериям валидности, результаты для всех образцов в постановке считаются недостоверными, требуется повторить исследование всех исследуемых образцов и контролей.

Отрицательный контроль (ОКО) тестируется, начиная с этапа ПЦР, и позволяет дополнительно контролировать возможную контаминацию ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться мРНК гена bcr-abl. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты для исследуемых образцов в постановке считаются недостоверными, необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование всех исследуемых образцов, в которых обнаружена мРНК гена bcr-abl, и контроля, начиная с этапа ПЦР.

1.3. Противоконтаминационные меры

Лаборатория, в которой будет использоваться тест-система, должна быть оснащена необходимым оборудованием, а весь рабочий процесс, необходимо выполнять поэтапно в разных зонах, не допуская возвращения образцов в предыдущие зоны. Оператор должен использовать СИЗы, своевременно менять одноразовые наконечники дозаторов и соблюдать базовые принципы работы в чистой зоне.

Рекомендуется не реже одного раза в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами.

Оценка загрязнения проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами.

1.4 Безопасность реагентов

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.
- Вещества, обладающие потенциальной инфекционной природой, отсутствуют.

2. КОМПЛЕКТАЦИЯ

«Diasens мРНК гена bcr» является универсальным диагностикумом, для проведения ОТ-ПЦР-РВ с мРНК из клинического материала. Тест-система позволяет выявлять и оценивать количественно мРНК химерного гена bcr-abl.

Набор может использоваться совместно с автоматическими станциями для приготовления и дозирования реакционных смесей.

Амплификацию можно проводить с использованием открытых приборов для амплификации с детекцией результата изменения флуоресценции в режиме реального времени.

2.1 Комплект Стандарт

«Diasens мРНК гена bcr» комплект Стандарт, рассчитан на проведение 100 исследований, представлен в таблице 2.1.

Таблица 2.1 «Diasens мРНК гена bcr» комплект Стандарт

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. ОТ-ПЦР-реагент	1 шт.	0,50 мл
2. Праймеры BCR	1 шт.	0,50 мл
3. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
4. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
5. ОКО	1 шт.	0,50 мл

Данный комплект представляет собой стандартный набор реагентов, который нужно пропорционально смешать согласно протоколу в таблице 4.2.1. Реагенты перед применением требуется тщательно разморозить и встряхнуть на вортексе. После смешивания разнести в пластик совместимый с используемым анализатором. Программа указана в п. 4.2. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках. Совместимость вариантов комплекта Стандарт с амплификаторами приведена в таблице 2.2.

Таблица 2.2 Характеристики вариантов комплекта Стандарт для совместимости с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (96)	до 200 мкл (96)	два вида (192)
	Без дополнительного расходного материала	011/5/1*	-	-	-
	Без дополнительного расходного материала	011/5/1a	-	-	-
	Без дополнительного расходного материала	011/5/1x	-	-	-
	0,2 ПЦР пробирка/одиночная, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/5/1b	011/5/1ba	011/5/1bb	011/5/1bc
	0,2 ПЦР пробирка/в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	011/5/1c	011/5/1ca	011/5/1cb	011/5/1cc
	0,1 ПЦР пробирка/в стрипе по 4, из оптически прозрачного пластика, для Rotor-Gene	011/5/1d	011/5/1da	011/5/1db	011/5/1dc
	Планшет высокий профиль, прозрачный	011/5/1e	011/5/1ea	011/5/1eb	011/5/1ec
	Планшет высокий профиль, белый	011/5/1f	011/5/1fa	011/5/1fb	011/5/1fc
	Планшет низкий профиль, прозрачный	011/5/1g	011/5/1ga	011/5/1gb	011/5/1gc
	Планшет низкий профиль, белый	011/5/1h	011/5/1ha	011/5/1hb	011/5/1hc

Где * - любая буква или цифра

2.2 Комплект Планшет

«Diasens мРНК гена bcr» комплект Планшет, рассчитан на проведение 96 исследований, представлена в таблице 2.2.1.

Таблица 2.2.1 «Diasens мРНК гена bcr» комплект Планшет

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. Планшет с ПЦР смесью в высушенном виде	1 шт.	-
2. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
3. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
4. ОКО	1 шт.	0,50 мл

В данном комплекте реагенты уже разнесены по лункам планшета и высушены на дне. Перед использованием необходимо удалить защитную пленку и внести образец в соответствующую лунку. Допускается использование планшетов не полностью, для этого необходимо отделить необходимое количество лунок. Программа указана в п. 4.2. Комплект оптимально подходит для планшетных анализаторов позволяющими проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках.

Таблица 2.2.2 Характеристики вариантов комплекта Планшет для совместимости с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт			
		нет	до 20 мкл (96)	до 200 мкл (96)	два вида (192)
	высокий профиль, прозрачный	011/5/2a	011/5/2aa	011/5/2ab	011/5/2ac
	высокий профиль, белый	011/5/2b	011/5/2ba	011/5/2bb	011/5/2bc
	низкий профиль, прозрачный	011/5/2c	011/5/2ca	011/5/2cb	011/5/2cc
	низкий профиль, белый	011/5/2d	011/5/2da	011/5/2db	011/5/2dc

2.3 Комплект Пробирки

«Diasens мРНК гена bcr» комплект Пробирки, рассчитан на проведение 96 исследований, представлена в таблице 2.3.1.

Таблица 2.3.1 Комплект реагентов Тест-система «Diasens ВПЧ НКР» комплект «Пробирки»

Компонент	Количество	Объем, не менее
1. Пробирки с ПЦР смесью в высушенном виде	96 шт.	-
2. ПКО-1	1 шт.	0,12 мл
3. ПКО-2	1 шт.	0,12 мл
4. ОКО	1 шт.	0,50 мл

В данном комплекте реагенты уже разнесены по пробиркам и высушены на дне. Перед использованием необходимо внести образец. Программа указана в п. 4.2. Комплект совместим со всеми типами анализаторов позволяющих проводить детекцию по каналам, указанным в адаптационных методиках.

Таблица 2.3.2 Характеристики вариантов комплекта Пробирка для совместимости с амплификаторами

Кат. №	Совместимость с прибором, характеристики	Дополнительные наконечники, шт	
		до 20 мкл	до 200 мкл
011/5/3a	0,2 ПЦР пробирка/одиночная или в стрипе, из оптически прозрачного пластика с плоской крышкой	нет	нет
011/5/3b	-/-	да (96)	нет
011/5/3c	-/-	нет	да (96)
011/5/3d	-/-	да (96)	да (96)

3. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С НАБОРОМ

- ПЦР-бокс;
- амплификатор детектирующий для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени;
- центрифуга-вортекс с функцией центрифугирования и встряхивания;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с выпуклой или плоской оптически прозрачной крышкой или пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. с прозрачными крышками или 96 луночные планшеты с оптически прозрачной пленкой – при использовании прибора планшетного типа и комплекта Стандарт;
- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР к Rotor-Gene объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – при использовании прибора роторного типа и комплекта Стандарт;
- штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов и оборудованием);
- штативы для пробирок объемом 1,5 – 2,0 мл;
- холодильник, поддерживающий температуру от +2 до +8°C, и морозильник, поддерживающий температуру от -16 до -24°C;
- пробирки объемом 1,5 / 2,0 мл при использовании комплекта Стандарт;
- штативы пластиковые для микропробирок объемом 1,5 / 2,0 мл;
- дозаторы полуавтоматические переменного объема (100 – 1000 мкл, 10 – 100 мкл, 5 – 50 мкл);
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
- средства индивидуальной защиты;
- емкость для сброса наконечников.

4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Подготовка образца

Работу с образцами для исследования до этапа экстракции следует проводить согласно нормам работы с потенциально инфекционным материалом.

Необходимо соблюдать требования к взятию, транспортированию, подготовке и хранению образцов исследуемого материала. Невыполнение данных требований может повлиять на эффективность экстракции НК.

Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории. (Санитарные нормы и правила «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 №2).

4.2. Подготовка реагентов к применению

Выделение НК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией изготовителя реагентов для выделения нуклеиновых кислот.

Внимание! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением исследований.

4.2.1 Комплект Стандарт

1. Разморозить все реагенты при комнатной температуре, при этом использование нагрева недопустимо. При возможности, избегать попадание прямых солнечных лучей на компонент «Праймеры BCR» в процессе разморозки.
2. Когда визуально в растворе не наблюдается льда, перемешать компонент переворачивая пробирку или кратким встряхиванием на вортексе.
3. Чтобы избежать потерь реагентов от зависания капель на крышке или стенках пробирки необходимо кратковременное центрифугирование от 2 000 об/мин (допустимо выше) не более 30 сек.
4. Приготовить реакционную смесь согласно таблице 4.2.1 в отдельной чистой пробирке объемом 1,5 – 2,0 мл:

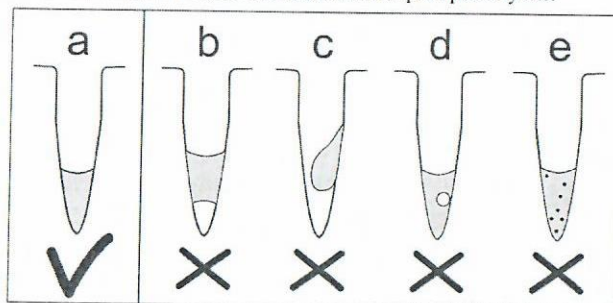
Таблица 4.2.1 Расчёт количества реагентов для реакционной смеси

Количество реакций Реагент	Количество реагента на реакцию, мкл																		
	1	5	6	8	10	12	16	24	32	36	40	48	56	64	72	80	88	96	100
ОТ-ПЦР-реагент	5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Праймеры BCR	5	25	30	40	50	60	80	120	160	180	200	240	280	320	360	400	440	480	500
Итоговый объем смеси	10	50	60	80	100	120	160	240	320	360	400	480	560	640	720	800	880	960	1000

При расчёте общего количества каждого компонента нужно учитывать количество реакций, включая исследуемые образцы и контроли (ПКО 1, ПКО 2, ОКО).

5. Перемешать приготовленную реакционную смесь кратким встряхиванием на вортексе не допуская вспенивания, осадить кратковременным центрифугированием.
6. Подготовить пробирки объемом 0,1 – 0,2 мл, совместимые с анализатором, на котором будет проводиться исследование. Разнести реакционную смесь по 10 мкл в пробирки для проведения анализа.
7. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл исследуемых образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке 20 мкл.
8. В пробирки, подготовленные для контрольных образцов, внести контроли (ПКО 1, ПКО 2, ОКО).
9. Убедитесь, что жидкость в каждой лунке / пробирке находится на дне (рис. 1a) и не содержит пузырьков (рис. 1b и 1d) и/или механических примесей (рис. 1e).

Рисунок 1 – Наглядное положение жидкости в пробирке / лунке.



10. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок / пробирок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
11. Герметично закрыть пробирки крышками/заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой.

4.2.2 Комплект Планшет

1. Снять упаковочную пленку с планшета с ПЦР-смесью.
2. Используя наконечник с фильтром в подготовленные лунки добавить по **20 мкл** исследуемых и контрольных образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 лунке **20 мкл**.
3. Убедитесь, что жидкость в каждой лунке находится на дне и не содержит пузырьков и/или магнитных частиц (рис.1).
4. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках лунок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить, используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.
5. Герметично заклеить планшеты оптически прозрачной пленкой. Не использовать упаковочную пленку!

4.2.3. Комплект Пробирки

1. Подготовить необходимое количество пробирок
2. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по **20 мкл** исследуемых и контрольных образцов. Общий объем реакционной смеси в 1 пробирке **20 мкл**.
3. Убедитесь, что жидкость в каждой пробирке находится на дне и не содержит пузырьков и/или магнитных частиц (рис.1).
4. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием, при попадании магнитных частиц – удалить,

используя отдельный наконечник для каждого образца. При экстракции методом сорбции на силикагеле необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

5. Герметично закрыть пробирки крышками.

4.3. Программирование прибора

1. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки /планшет в амплификатор.
2. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно протоколу амплификации. Обобщенная программа амплификации приведена в таблице 4.2. Программа амплификации зависит от используемого прибора и выбранного варианта комплекта. Более подробная программа амплификации и пошаговое описание настройки прибора для первого запуска приведена в адаптационных методиках. При возникновении необходимости помощи в программировании прибора Вы можете обратиться к производителю (e-mail: pcrproduction@diasens.by, тема: Программирование амплификаторов).

Табл. 4.2 Программа амплификации

№ блока	Тип блока	Шаг	Температура, °C	Время	Детекция	Количество циклов
1	Hold/ Удержание температуры	Обратная транскрипция	55	20 мин	–	1
2	Hold/ Удержание температуры	Начальная денатурация	95	15 мин	–	1
3	Cycling/ Циклирование	Денатурация	95	10 сек	–	45
		Отжиг	60	15 сек*	+: FAM, HEX**, ROX, Cy5, Cy5.5	
		Элонгация	67	15 сек	–	

* - В случае невозможности задать данное время на приборе, указывается минимальное.

** - Детекция сигнала для флуорофора HEX аналогична флуорофорам R6G, JOE и VIC и может варьироваться.

Ориентировочное время работы прибора 80-100 мин.

3. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Также допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончании, если это позволяет программное обеспечение прибора.
4. Дать название эксперимента и сохранить его на диске (в этом файле будут автоматически сохранены результаты данного эксперимента). Запустить амплификатор.

Примечание: одновременно можно проводить различные исследования при условии совпадения программ амплификации.

4.4. Анализ и интерпретация результатов

Количественное определение мРНК химерного гена bcr-abl основывается на существовании линейной зависимости между исходной концентрацией мРНК гена в исследуемом образце и циклом начала экспоненциального увеличения флуоресцентного сигнала (пороговый цикл, Cycle threshold, Ct). При проведении количественного теста амплификации из исследуемых образцов проводится одновременно ПКО-1 и ПКО-2, которые выступают в качестве калибраторов - образцов с известной концентрацией ДНК-мишеней. По результатам амплификации калибраторов строится калибровочная линия с известной эффективностью амплификации, по которой происходит определение концентрации ДНК-мишени в исследуемых образцах.

1. Параметры анализа для конкретного прибора указаны в адаптационных методиках.
2. После установления значения пороговой линии необходимо выбрать логарифмическую шкалу для отображения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.
3. Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов (см. адаптационные методики).
4. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно, т.е. контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в адаптационных методиках и паспорте.

В случае несоответствия контрольных точек (ОКО, ПКО-1, ПКО-2) требуемым значениям – анализ необходимо переделать.

5. Для количественного анализа используются значения концентрации ДНК-мишени в ПКО-1 и ПКО-2 (указаны в паспорте). При использовании ПО к амплификатору, калибровочная прямая строится на основании значения Ct автоматически. При применении открытого ПО для оценки вирусной нагрузки, количественная оценка производится автоматически и данные количественной оценки с прибора не требуются. Подробнее данная процедура описана в адаптационных методиках.
6. Для расчёта качественных и количественных критериев исследования можно использовать электронный файл или ПО, производства УП «Диагенс». Для его получения обратитесь по e-mail: pcrproduction@diasens.by

5. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ РЕШЕНИЕ

- Недостоверный результат. Результат является недостоверным при отсутствии сигнала по всем каналам детекции, а также при регистрации слабоположительного сигнала по каналам детекции ДНК ВПЧ при отсутствии сигнала по каналу ДНК человека. К появлению недостоверного результата может привести низкий выход или отсутствие нуклеиновых кислот в элюате. Требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК, если это возможно, с применением другого метода экстракции.

• Ингибирование ПЦР.

- Нарушение протокола экстракции НК. При нарушении протокола экстракции НК в элюате могут находиться ингибиторы ПЦР. Требуется повторно провести исследование начиная с этапа экстракции НК.
- Попадание в ПЦР-смесь посторонних агентов. Попадание в ПЦР-смесь сорбента или магнитных частиц может привести к ингибированию ПЦР. При внесении нуклеиновых кислот необходимо отслеживать попадание сорбента или магнитных частиц в реакционную смесь, при их наличии – удалить / заменить данную реакционную смесь.
- Контаминация специфичной ДНК. Наличие сигнала по любому из каналов в отрицательном контроле свидетельствует о наличии контаминации. Необходимо принять меры по выявлению и устранению источника загрязнения и повторить исследование для всех образцов.
- Неправильный анализ результатов
 - Некорректная обработка результатов. Некорректно обработанные отрицательные образцы имеют вид прямых линий, идущих снизу-вверх. Положительный образец имеет специфическую S-образную кривую накопления флуоресценции. Необходимо отключить учет первых 5 циклов в соответствии с инструкцией прибора. При необходимости данное значение может быть изменено в диапазоне 5–10 циклов.
 - Неправильный подбор уровня пороговой линии. Для исследуемого образца определено значение порогового цикла, при этом на графике флуоресценции отсутствует участок характерного экспоненциального подъема (график представляет собой приблизительно прямую линию). Необходимо проверить правильность выбранного уровня пороговой линии или параметров расчета базовой линии. Если результат получен при правильном уровне пороговой линии (базовой линии), требуется повторно провести амплификацию и детекцию для этого образца.
- Некачественный отбор биоматериала. Отсутствие положительного сигнала по каналу детекции человеческого материала при повторном исследовании свидетельствует о некачественном отборе биоматериала. Требуется повторный отбор биоматериала.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

6.1. Срок годности

Срок годности тест-систем составляет 12 месяцев с даты изготовления. После вскрытия тест-системы использовать до истечения срока годности. На результаты полученные с применением тест-системы с истекшим сроком годности гарантии производителя не распространяются.

6.2. Транспортировка

Транспортировка тест-систем осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше 37 °С (до 5 суток) или при температуре от +2 до +8°С (до 30 суток). Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

6.3. Хранение

Тест-системы хранить при температуре от -16 до -24°C в течение всего срока годности. Допускается замораживание/размораживание тест-системы не более 10 раз. Тест-системы после вскрытия хранить в тех же условиях, что и до вскрытия. На результаты полученные с применением тест-системы, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, гарантии производителя не распространяются.

6.4. Гарантии производителя

Производитель гарантирует соответствие тест-систем требованиям, изложенным в технической и эксплуатационной документации, при условии соблюдения всех условий транспортирования, хранения и применения в течение указанного срока годности.

Рекламации по качеству реагентов «Тест-системы для выявления возбудителей заболеваний, передающихся половым путем» направлять в производственное унитарное предприятие «Диасенс»:

E-mail: perproduction@diasens.by;

Телефон: +375 17 320-65-10;

Почтовый адрес: 223060, Республика Беларусь, Минская обл., Минский р-н, Новодворский с/с, р-н д. Большое Стиклево, S-Union, ячейка 43.

При выявлении нежелательных реакций при использовании тест-систем, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте производителя: <http://diasens.by/>.

7. УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Символы опасности
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению		