IVD

Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14»
по ТУ 21.20.23-037-09286667-2019

«АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14»

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

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

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ 3
1. НАЗНАЧЕНИЕ 4
1.1. Область применения 4
1.2. Показания к применению 4
1.3. Противопоказания к применению 4
2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 4
2.1. Состав и комплектность 4
2.2. Принцип метода 5
2.3. Прослеживаемость значений калибраторов K1 ВПЧ скрининг и K2 ВПЧ скрининг 7
2.4. Техническое обслуживание и ремонт 7
3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА 7
3.1. Внутренний контроль качества 7
3.2. Рекомендуемые контрольные материалы 9
4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ 9
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ 10
6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ 12
6.1. Взятие исследуемого материала 12
6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала, взятого в транспортную среду для жидкостной цитологии 12
6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов 13
6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов 13
7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ 15
7.1. Мазки со слизистой оболочки влагалища 15
7.2. Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала 15
7.3. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры 18
7.4. Соскобы эпителия со слизистой оболочки прямой кишки 18
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 18
8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала 19
8.2. Подготовка реагентов для амплификации 19
8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции 20
8.4. Анализ и вычисление результатов 21
8.5. Интерпретация результатов 22
8.6. Возможные ошибки 24
8.7. Диагностическое значение полученного результата 24
9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА 25
9.1. Предел обнаружения 25
9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения 25
9.3. Аналитическая специфичность 25
9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения 26
9.5. Правильность измерения 28
9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность 29
9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ и ДНК человека 30
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА 31
10.1. Срок годности 31
10.2. Транспортирование 31
10.3. Хранение 32
11. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 32
12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ 33

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

CIN2+	–	дисплазия средней и высокой степени, рак шейки матки
Ct	–	Cycle threshold (пороговый цикл)
«АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14»	–	Набор реагентов для качественного и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» по ТУ 21.20.23-037-09286667-2019
ВКО	–	внутренний контрольный образец
ВПЧ ВКР	–	вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	–	дезоксирибонуклеаза
дНТФ	–	дезоксирибонуклеотидтрифосфаты
ИППП	–	инфекции, передаваемые половым путем
К-	–	отрицательный контроль ПЦР
К1	–	калибровочный образец 1, положительный контроль ПЦР
К2	–	калибровочный образец 2, положительный контроль ПЦР
ОК	–	отрицательный контроль экстракции
ОКО	–	отрицательный контрольный образец
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РУ	–	регистрационное удостоверение
УДГ	–	урацил-ДНК-гликозилаза

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Предназначен для качественного и количественного определения 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 (соскобный материал 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) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени».

Материалом для проведения ПЦР служат пробы ДНК, экстрагированные из исследуемого материала с помощью наборов реагентов, рекомендованных в инструкции по применению набора в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

1.1. Область применения

Набор используется в клинической лабораторной диагностике для исследования биологического материала, полученного от лиц с подозрением на наличие инфекций урогенитального тракта. Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания.

1.2. Показания к применению

Набор используется для комплексного анализа, направленного на выявление ИППП в биологическом материале, полученном в ходе скрининговых исследований, с целью подтверждения диагноза и мониторинга лечения.

1.3. Противопоказания к применению

Нарушение целостности упаковки, истекший срок годности, несоблюдение требований инструкции.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав и комплектность

Состав набора и комплектность поставки указаны в таблице 1 и 2 соответственно. Набор рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли. Набор предназначен для проведения амплификации ДНК с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и может использоваться совместно с амплификаторами планшетного и роторного типа. Для проведения полного исследования необходимо использовать наборы реагентов для экстракции ДНК, рекомендованные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

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

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

Таблица 1

Состав набора

Реагент	Объем, мл	Количество	Описание
ПЦР-смесь ВПЧ-скрининг	1,10	1 пробирка	Буферный раствор со специфическими праймерами, флуоресцентно-мечеными зондами и дНТФ. Прозрачная жидкость.
Буфер В	0,60	1 пробирка	Буферный раствор с термостабильной ДНК-полимеразой Taq, сульфатом магния и урацил-ДНК-гликозилазой. Прозрачная жидкость.
К1 ВПЧ скрининг	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
К2 ВПЧ скрининг	0,12	1 пробирка	Положительный контрольный образец, ДНК-калибратор. Прозрачная жидкость.
ОКО	1,10	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
К-	0,26	1 пробирка	Отрицательный контрольный образец. Прозрачная жидкость.
Программное обеспечение «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО» версия 1.0[1]	-	-	На USB флэш-накопителе.

Таблица 2

Комплектность набора

Компонент	Формат	Количество
Набор реагентов	-	1
Инструкция по применению набора	в электронном виде на USB флэш-накопителе и на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/	1
Краткое руководство по применению набора	в бумажном виде	1
Вкладыш к набору	в бумажном виде	1
Паспорт качества	в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/passport/	1
Руководство оператора	в электронном виде на USB флэш-накопителе и на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/	1

2.2. Принцип метода

Принцип тестирования основан на проведении одновременной реакции амплификации участков ДНК выявляемых типов ВПЧ ВКР и ДНК β-глобинового гена человека (внутренний эндогенный контроль) при помощи специфичных к этим участкам

[1] Класс безопасности программного обеспечения в соответствии с ГОСТ Р МЭК 62304 – класс А.

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

праймеров и фермента Taq-полимеразы. Детекция продуктов амплификации происходит путем измерения флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» за счет использования в составе реакционной смеси флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (зондов). Зонды гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

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 количественного теста амплификация ДНК из исследуемых образцов проводится одновременно с калибраторами К1 ВПЧ скрининг и К2 ВПЧ скрининг – образцами 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 100 000 клеток человека для снижения влияния качества забора биологического материла.

Набор содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ) и трифосфата дезоксиуридина. Фермент УДГ распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси дНТФ в реагентах для амплификации. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом УДГ до начала амплификации ДНК-мишени, и, следовательно, они не могут быть в дальнейшем амплифицированы.

Фермент УДГ термолабилен и инактивируется при нагревании выше 50 °С и поэтому не разрушает ампликоны мишени, нарабатываемые в процессе ПЦР.

На этапе амплификации в одной пробирке одновременно амплифицируются участки ДНК ВПЧ ВКР и ДНК β-глобинового гена человека (эндогенный ВКО). Результаты амплификации регистрируются по четырем различным каналам флуоресцентной детекции (см. таблицу 3).

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

Таблица 3

Соответствие ДНК-мишеней и каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	FAM	R6G[2]	ROX	Cy5
ДНК-мишень	ДНК ВПЧ 16	ДНК ВПЧ 18	ДНК ВПЧ (типы: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	ДНК β-глобинового гена человека (эндогенный ВКО)
Область амплификации	E6 gene	E6 gene	E7, E6 gene	β–globin gene

2.3. Прослеживаемость значений калибраторов К1 ВПЧ скрининг и К2 ВПЧ скрининг

Измерение значений концентрации калибраторов К1 ВПЧ скрининг и К2 ВПЧ скрининг производится относительно рабочих калибраторов производства ООО «НекстБио». Концентрацию рабочих калибраторов определяют стандартизированной методикой прямого измерения концентрации контрольных образцов на основе генно-модифицированных конструкций с использованием спектрофотометра. Коэффициент вариации измерений аттестованного значения концентраций калибраторов К1 ВПЧ скрининг и К2 ВПЧ скрининг составляет не более 5% (с уровнем доверительной вероятности 95%).

2.4. Техническое обслуживание и ремонт

Набор не подлежит техническому обслуживанию и ремонту.

3. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

3.1. Внутренний контроль качества

3.1.1. Отрицательный и положительный контроли исследования

Для оценки качества получаемых результатов каждая группа экстрагируемых образцов должна включать отрицательный контрольный образец (ОКО). Каждая индивидуальная постановка ПЦР должна включать: отрицательный контроль (К-) и положительные контроли (К1 ВПЧ скрининг и К2 ВПЧ скрининг). Результаты для контролей должны соответствовать заданным критериям валидности, указанным в разделе «Интерпретация результатов».

Отрицательный контрольный образец (ОКО) тестируется, начиная с этапа экстракции, и позволяет контролировать возможную контаминацию другими образцами или ампликонами. В пробирке с отрицательным контролем не должна детектироваться ДНК ВПЧ. В случае несоответствия результата, полученного для контрольного образца, заданным критериям валидности, положительные результаты

[2] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, VIC.

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

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 экстракции.

Отрицательный контроль (К-) 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.

В качестве положительного контроля ПЦР используются реагенты К1 ВПЧ скрининг и К2 ВПЧ скрининг, входящие в состав набора. 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, начиная с этапа ПЦР.

3.1.2. Анализ калибровки

Количественная оценка концентрации ДНК исследуемых образцов проводится относительно количественно охарактеризованных калибровочных образцов К1 ВПЧ скрининг и К2 ВПЧ скрининг. Исследование калибровочных образцов К1 ВПЧ скрининг и К2 ВПЧ скрининг проводится параллельно с исследованием образцов, начиная с этапа ПЦР. Определение концентрации ДНК производится в соответствии с заданными значениями концентраций калибровочных образцов К1 ВПЧ скрининг и К2 ВПЧ скрининг и полученными значениями порогового цикла (Ct) для калибровочных образцов К1 ВПЧ скрининг и К2 ВПЧ скрининг и исследуемых образцов. Эффективность калибровки укладывается в заданный диапазон. Если эффективность калибровки не укладывается в заданный диапазон, необходимо повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

3.1.3. Контроль ингибирования и качества забора материала

Для оценки качества забора биоматериала и контроля всех этапов исследования, эффективности экстракции ДНК и оценки влияния ингибиторов ПЦР предусмотрено использование эндогенного ВКО - ДНК β-глобинового гена человека, который присутствует в каждом исследуемом образце, содержащем клинический материал от человека, и контрольных калибраторах. Результаты исследования ВКО должны

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

соответствовать заданным критериям валидности для положительных и отрицательных исследуемых образцов, указанным в разделе «Интерпретация результатов». Если в исследуемых образцах не обнаружена ДНК β-глобинового гена человека (эндогенный ВКО), то результаты исследования данных образцов считаются невалидными, требуется повторить их анализ, начиная с этапа забора материала.

3.1.4. Мониторинг лаборатории на наличие контаминации

Рекомендуется раз в месяц проводить мониторинг лаборатории на контаминацию продуктами амплификации, исследуемыми образцами, положительными контрольными образцами. Оценка наличия/отсутствия контаминации проводится путем исследования смывов с различных объектов: пипеток, рабочих поверхностей лабораторной мебели, оборудования и поверхностей помещений. Взятие и исследование смывов следует проводить согласно процедуре, описанной в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». При обнаружении контаминации необходимо провести обработку лаборатории моющими и дезинфицирующими растворами согласно указаниям, описанным в МУ 1.3.2569-09.

3.2. Рекомендуемые контрольные материалы

В качестве контрольных материалов для проверки заявленных функциональных характеристик набора могут быть использованы зарегистрированные на территории Российской Федерации панели контрольных образцов, предназначенные для проведения внутреннего и внешнего контролей качества лабораторных исследований по обнаружению ДНК выявляемых микроорганизмов.

4. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Набор применяется только для диагностики *in vitro*.

4.2. Набор предназначен для работы только с исследуемым материалом, указанным в разделе «Назначение». Исследование других видов биологического материала может привести к получению недостоверных результатов.

4.3. Получение достоверных результатов обеспечивается выполнением требований, предъявляемых к взятию, транспортированию и хранению образцов исследуемого материала (см. раздел «Исследуемый материал»).

4.4. Применение набора возможно только персоналом, обученным методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

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

4.5. При работе с набором следует использовать только амплификаторы с системой детекции флуоресцентного сигнала, характеристики которых удовлетворяют требования, указанные в разделе «Дополнительное оборудование и материалы».

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

5.1. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5.2. При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор строго по назначению в соответствии с данной инструкцией. Отклонение от прописанных процедур и порядка действий может привести к получению недостоверных результатов анализа.

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ следует проводить в отдельных помещениях (зонах) в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08.

- Удалять неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, упаковку[3], биологический материал[4], включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого,

[3] Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.
[4] Биологический материал, включая инструменты и предметы, загрязненные материалом, относятся к классу опасности медицинских отходов Б.

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

поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Набор предназначен для однократного применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества образцов (см. раздел «Состав и комплектность»).

- К работе с набором допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08).

- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.

- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не смешивать реагенты разных серий.

- Не использовать набор по истечении срока годности.

- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.

- Не есть, не пить и не курить в процессе использования набора. Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Не глотать.

- При контакте немедленно промыть пораженное место большим количеством воды и при плохом самочувствии обратиться за медицинской помощью. При попадании внутрь, рвоту не вызывать, прополоскать рот водой, обратиться к врачу при плохом самочувствии.

5.3. При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен. Реагенты набора содержат натрия азид в концентрации не более 0,1 % и соответственно не классифицируются как опасные и не требуют соблюдения специальных мер предосторожности.

5.4. Специфические воздействия набора на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.

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

- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

6. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6.1. Взятие исследуемого материала

6.1.1. Транспортная среда с муколитиком для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры), содержащая консервант.

6.1.2. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала (соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки), содержащая изотонический водно-солевой раствор с консервантом.

6.1.3. Транспортная среда для взятия, транспортирования и хранения биологического материала для жидкостной цитологии (соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала), содержащая консервант, спирты, натрий-фосфатный буферный раствор, солевые растворы и др.

6.1.4. Зонд для взятия биологического материала (соскобный материал или отделяемое слизистых оболочек урогенитального тракта (мазки со слизистой оболочки влагалища, соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала, соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры, прямой кишки), однократного применения, изготовленный из полипропилена, состоящий из головки (рабочая часть) и ручки. Рабочая часть зонда может отламываться по имеющейся насечке.

6.1.5. Щетка эндоцервикальная / цитощетка для взятия биологического материала для жидкостной цитологии (соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала) однократного применения, стерильная.

6.1.6. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 5,0 мл, для взятия биологического материала для жидкостной цитологии.

6.2. Предварительная подготовка исследуемого материала, взятого в транспортную среду для жидкостной цитологии

6.2.1. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 5 мл.

6.2.2. Микроцентрифужные одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.

6.2.3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 1000 мкл.

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

6.2.4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 200 мкл.

6.2.5. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и 5 мл.

6.2.6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл с ускорением не менее 10 000 g.

6.2.7. Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.

6.2.8. Центрифуга-вортекс.

6.2.9. Автоматический дозатор переменного объема на 1000 мкл.

6.3. Экстракция ДНК из исследуемых образцов

6.3.1. Набор реагентов для экстракции ДНК «МагноПрайм ФАСТ» (РУ № РЗН 2019/8043), «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (РУ № ФСР 2012/14204), «МагноПрайм ВПЧ», либо любой другой рекомендованный производителем набор, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- набор позволяет выделять ДНК из биологического материала (соскобный материал 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)) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции;
- набор не относится к экспресс-методам экстракции ДНК;
- набор позволяет исследовать образцы объемом не менее 100 мкл;
- набор позволяет проводить элюцию очищенной ДНК в объеме не менее 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! При исследовании образцов, взятых в транспортную среду для жидкостной цитологии, необходимо использовать набор реагентов «МагноПрайм ВПЧ».

6.3.2. Дополнительные материалы и оборудование, необходимые для экстракции ДНК, – согласно инструкции к набору реагентов для экстракции ДНК.

6.4. Амплификация, детекция продуктов амплификации, анализ и интерпретация результатов

6.4.1. Одноразовые полипропиленовые пробирки, свободные от ДНКаз, следующих видов:

- завинчивающиеся пробирки и крышки к ним или плотно закрывающиеся

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

пробирки объемом 1,5 мл – для приготовления реакционной смеси;

- 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 – для проведения ПЦР при использовании прибора планшетного типа;

- тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой или пробирки для ПЦР объемом 0,1 мл в стрипах по 4 шт. с крышками – для проведения ПЦР при использовании прибора роторного типа.

6.4.2. Одноразовые наконечники, свободные от ДНКаз, для дозаторов переменного объема с фильтром от 100 до 1000 мкл.

6.4.3. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл или 0,1 мл (в соответствии с используемыми пробирками для ПЦР).

6.4.4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).

6.4.5. Центрифуга-вортекс.

6.4.6. Автоматические дозаторы переменного объема.

6.4.7. Станция автоматическая с модулем для приготовления и раскапки реакционных смесей и комплект расходных материалов к ней согласно инструкции Производителя.

6.4.8. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» роторного типа – Rotor-Gene Q, либо планшетного типа – QuantStudio 5 или C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96, либо аналогичный, рекомендованный производителем, зарегистрированный в РФ и соответствующий следующим требованиям:

- наличие независимых каналов флуоресцентной детекции для флуорофоров FAM, R6G, ROX, Cy5 с характеристиками, указанными в таблице 4.

Таблица 4

Требуемые характеристики каналов флуоресцентной детекции

Канал для флуорофора	Длины волн, нм			
	Возбуждения		Детекции	
	Минимум	Максимум	Минимум	Максимум
FAM	450	470	510	530
R6G	515	532	545	580
ROX	565	585	605	650
Cy5	620	640	660	690

- для приборов планшетного типа наличие подогреваемой крышки с температурой более 100°C;

- точность поддержания температуры ≤ ±0,4°C;

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

- скорость нагрева не менее 2°С/сек;
- скорость охлаждение не менее 1°С/сек.

6.4.9. Холодильник от 2 до 8 °С.

6.4.10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки в соответствии с МУ 1.3.2569-09.

6.4.11. Емкость для сброса наконечников.

7. ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Материалом для исследования служит соскобный материал 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)).

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого биологического материала следует проводить в соответствии с нижеперечисленными требованиями, несоблюдение которых может привести к получению некорректных результатов исследования.

7.1. Мазки со слизистой оболочки влагалища

Взятие материала провести из заднебокового свода влагалища с помощью стерильного одноразового зонда-тампона или универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии с инструкцией по применению зонда. Необходимо максимально полно собрать отделяемое. Рабочую поверхность зонда поместить в транспортную среду, обломав пластиковую основу. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

ВНИМАНИЕ! Во избежание контаминации, нельзя обрезать зонд ножницами!

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

7.2. Соскобы эпителия со слизистой оболочки цервикального канала

7.2.1. Взятие материала

Перед получением материала слизь и отделяемое влагалища с поверхности шейки матки удалить стерильным марлевым тампоном.

Взятие материала провести из цервикального канала:

- с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощетки в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии с инструкцией по применению цитощетки / зонда;

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

- с помощью стерильной одноразовой цервикальной цитощетки в пробирку с транспортной средой для жидкостной цитологии, содержащей спирты, натрий-фосфатный буферный раствор, солевые растворы и др., в соответствии с инструкцией по применению цитощетки.

При использовании универсального зонда объем соскобного отделяемого будет меньше. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде цервикальной слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

7.2.2. Предварительная подготовка образцов, взятых в транспортную среду для жидкостной цитологии

Отобрать аликвоту клеток для исследования методом ПЦР одноразовыми наконечниками с фильтром в одноразовую пробирку. Рекомендуется сначала отобрать аликвоту клеток для ПЦР-исследования, после отобрать аликвоту клеток – для проведения жидкостной цитологии.

7.2.2.1. Подготовка эпителиальных клеток (выбрать один из вариантов)

Вариант 1

а) Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток и оставить на 12 часов для осаждения клеток.

б) Аккуратно из раствора отобрать **0,5 – 1,0 мл осевших клеток** со дна флакона и перенести в чистую пробирку объемом 1,5 мл, на пробирке указать название образца.

в) Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.

г) Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок. В пробирке должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

Вариант 2

а) Флаконы с образцами (в транспортной среде для жидкостной цитологии) интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток.

б) Аккуратно из раствора отобрать **2 – 5 мл клеточной суспензии** (в зависимости от ее плотности) и перенести в чистую пробирку объемом 5 мл, на пробирке указать название образца.

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

в) Пробирки с образцами центрифугировать при **600 g** (3000 об/мин) **не менее 10 минут** или оставить пробирки в штативе при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) на 12 часов для осаждения клеток.

г) Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок.

д) В пробирке на 5 мл должно остаться 900 - 1000 мкл осадка. Перенести в чистую пробирку на 1,5 мл весь объем осадка.

е) Центрифугировать пробирки с клетками при **10 000 g** не менее **2 мин**.

ж) Аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя автоматический дозатор или вакуумный отсасыватель, не захватывая осадок. В пробирке на 1,5 мл должно остаться 100 - 200 мкл осадка.

7.2.2.2. Отмывка эпителиальных клеток

а) В каждую пробирку с осадком клеток внести по **1 мл М-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ». Тщательно перемешать пробирки на вортексе и поставить осаждаться на **30 мин** в штативе.

ВНИМАНИЕ! Если по истечении 30 минут в пробирке видны следы не растворившейся слизистой пробки, необходимо дополнительно перемешать пробирку на вортексе и оставить в штативе еще на 15 мин.

б) Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин**.

в) Аккуратно удалить надосадочную жидкость по стенке пробирки, не захватывая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробы. Оставить 100 - 200 мкл осадка.

г) В каждую пробирку внести по **1 мл Ф-буфера** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно перемешать на вортексе.

д) Пробирки с образцами центрифугировать при **10 000 g** в течение **2 мин**.

е) Отобрать надосадочную жидкость аналогично п. в). Оставить 100 - 200 мкл осадка. Далее, аккуратно удалить остаток надосадочной жидкости, не захватывая осадок, из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром на 200 мкл, используя автоматический дозатор.

ж) В каждую пробирку с осадком клеток внести по **100 мкл Ц-лизина** из набора «МагноПрайм ВПЧ», тщательно ресуспендировать осадок пипетированием,

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

используя отдельный наконечник с фильтром на 200 мкл для каждой пробы. Пробирки перемешать на вортексе.

з) Инкубировать пробы **не менее 2 часов (допускается оставить на ночь)** при температуре **60 ºС**.

7.3. Соскобы эпителия со слизистой оболочки уретры

Взятие эпителиального соскоба из уретры проводить с помощью стерильного одноразового универсального зонда в пробирку с транспортной средой с муколитиком в соответствии с инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи и крови.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде.

7.4. Соскобы эпителия со слизистой оболочки прямой кишки

Перед взятием мазка провести тщательный туалет с мылом и водой области вокруг анального отверстия.

Взятие материала провести с поверхности боковых стенок ампулы прямой кишки с помощью одноразового стерильного зонда-тампона из полипропилена/полистирола с вискозой или хлопком, в пробирку с транспортной средой, содержащей изотонический водно-солевой раствор с консервантом, в соответствии с инструкцией по применению зонда. Допустимо минимальное присутствие примесей в виде слизи, крови, гноя и каловых масс.

Биологический материал, помещенный в транспортную среду, хранить и транспортировать согласно требованиям, указанным в инструкции к используемой транспортной среде. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование должно проводиться при нормальных показателях микроклимата клинико-диагностической лаборатории[5]:

- температура окружающего воздуха от 20 до 28 °С;
- относительная влажность 40 – 75 %.

[5] Указаны допустимые нормы температуры и относительной влажности воздуха в рабочей зоне производственных помещений в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

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

8.1. Экстракция ДНК из исследуемого материала

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в разделе «Дополнительное оборудование и материалы». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

ВНИМАНИЕ! При проведении исследования недопустимо использование экспресс-методов экстракции ДНК.

Каждая группа экстрагируемых образцов должна сопровождаться постановкой отрицательного контроля (ОКО) в одном повторе.

В процессе экстракции ДНК использовать следующие объемы реагентов и исследуемых образцов:

- объем исследуемого образца – **100 мкл** в пробирки для исследуемых образцов;
- объем реагента ОКО – **100 мкл** в пробирку для ОКО;
- объем реагента, используемого для элюции ДНК, – **100 мкл**.

8.2. Подготовка реагентов для амплификации

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

8.2.1. Рассчитать объемы для **ПЦР-смеси ВПЧ-скрининг** и **Буфера В**, требующиеся для приготовления реакционной смеси (см. таблицу 5). Смесь готовить на общее число исследуемых и контрольных образцов плюс запас не менее чем на одну реакцию.

Таблица 5

Расчет объемов компонентов реакционной смеси

Реагент	Объем, мкл	Обозначения
ПЦР-смесь ВПЧ-скрининг	**10,0***(N+1)	**N** – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В	**5,0***(N+1)	

8.2.2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с **ПЦР-смесью ВПЧ-скрининг** и **Буфером В**, осадить капли на вортексе.

8.2.3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 8.2.1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.

8.2.4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции. Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора с системой детекции в режиме «реального времени».

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

8.2.5. Внести в пробирки по **15 мкл** приготовленной **реакционной смеси**.

ВНИМАНИЕ! Неиспользованные остатки реакционной смеси хранению не подлежат.

8.3. Внесение проб ДНК, проведение амплификации и детекции

ВНИМАНИЕ! При добавлении проб ДНК, экстрагированных с помощью наборов реагентов для проведения экстракции методом сорбции на силикагеле или магнитной сепарации, необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

ВНИМАНИЕ! Программирование и запуск амплификатора проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

8.3.1. Внести в подготовленные пробирки с реакционной смесью по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции.

8.3.2. Внести контрольные образцы.

Для качественного определения ДНК:

а) положительный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К2** внести **10 мкл К2 ВПЧ скрининг**.

б) отрицательный контроль экстракции – в одну пробирку для образца **ОК** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

в) отрицательный контроль ПЦР – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

Для количественного определения ДНК:

а) Образец **К1** – в одну пробирку внести **10 мкл К1 ВПЧ скрининг**.

б) Образец **К2** – в одну пробирку внести **10 мкл К2 ВПЧ скрининг**.

в) отрицательный контроль экстракции (ОК) – в одну пробирку для образца **ОК** внести **10 мкл пробы, экстрагированной из ОКО**.

г) отрицательный контроль ПЦР (К-) – в одну пробирку для образца **К-** внести **10 мкл реагента К-**.

8.3.3. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» для выполнения единой программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. таблицу 6).

Таблица 6

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[6], ROX, Cy5	

[6] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE и VIC.

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

Примечание - С использованием единой программы можно одновременно проводить в одном приборе любое сочетание тестов, включая тесты с обратной транскрипцией и амплификацией. При одновременном проведении нескольких тестов детекция флуоресцентного сигнала назначается и по другим используемым каналам, помимо указанных в таблице. В случае если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из данной программы первый шаг обратной транскрипции (50 °С – 15 минут) для экономии времени.

8.3.4. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8.3.5. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

8.3.6. Прибор проводит регистрацию флуоресцентного сигнала автоматически в режиме «реального времени».

8.4. Анализ и вычисление результатов

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

ВНИМАНИЕ! Количественный анализ результатов возможно проводить только в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО» версии 1.0, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения. Руководство оператора и программное обеспечение находятся на USB флэш-накопителе, входящем в состав набора, а также на официальном сайте Производителя по адресу: http://www.nextbio.ru/reagents/. Необходимые значения для расчета результатов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Обработка и расчет результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов. Параметры обработки флуоресцентных кривых зависят от используемой модели амплификатора (см. вкладыш к набору и инструкцию по применению амплификатора).

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

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются по четырем каналам детекции (см. таблицу 7).

Таблица 7

Детекция флуоресцентного сигнала

Канал для флуорофора	FAM	R6G	ROX	Cy5
Продукт амплификации	ДНК ВПЧ тип 16	ДНК ВПЧ тип 18	ДНК ВПЧ (типы: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	ДНК β-глобинового гена человека (ВКО Glob)

На основании полученных значений порогового цикла (Ct) и заданных значений концентраций для калибраторов строится калибровочная кривая, по которой проводится расчет концентрации ДНК ВПЧ и количество геномов человека на 1 мл исследуемого образца/реакционную смесь. Полученные значения используются для расчета количества ДНК ВПЧ, приходящегося на 10^5 клеток человека. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека. Полученные значения концентраций ДНК человека позволяют оценить качество взятия биологического материала. Расчет нормированных значений концентрации ДНК ВПЧ производят по формуле:

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

где 2 – это коэффициент пересчета количества копий ДНК человека в количество клеток. Нормированные значения концентраций отражают количество копий возбудителя относительно клеток человека.

8.5. Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов можно проводить в двух вариантах:

- вручную в соответствии с таблицей 8 и вкладышем, прилагаемым к набору. Результат исследования считают достоверным, если получены правильные результаты для контролей в соответствии с таблицей 10;

- в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО» версии 1.0, согласно руководству оператора по применению программного обеспечения и вкладышу, прилагаемому к набору. Используемые в программном обеспечении алгоритм интерпретации результатов для исследуемых образцов и критерии валидности результатов, полученных для контролей, представлены в таблицах 9 и 10 соответственно.

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

Таблица 8

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении качественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу Cy5 не определено или определено выше граничного[7]	Невалидный
Значение Ct по каналу для флуорофора FAM, определено не выше граничного и значение Ct по каналу Cy5 определено не выше граничного	ДНК ВПЧ ВКР 16 типа обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора R6G, определено не выше граничного и значение Ct по каналу Cy5 определено не выше граничного	ДНК ВПЧ ВКР 18 типа обнаружена
Значение Ct по каналу для флуорофора ROX, определено не выше граничного и значение Ct по каналу Cy5 определено не выше граничного	Обнаружена ДНК ВПЧ ВКР одного или нескольких из перечисленных типов: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
Значения Ct по каналам для флуорофоров FAM, R6G и ROX, не определены или определены выше граничного значения, а значение Ct по каналу Cy5 определено не выше граничного	ДНК ВПЧ ВКР не обнаружена

Таблица 9

Интерпретация результатов для исследуемых образцов при проведении количественного анализа

Результат	Интерпретация
Значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 (ДНК человека) отсутствует или определено выше граничного[7], или определено, но при этом рассчитанное количество клеток человека в исследуемом образце менее 500 в реакцию	Невалидный! Недостаточное количество материала для анализа
Значение Ct по всем каналам для ВПЧ отсутствует, значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 (ДНК человека) определено не выше граничного, при этом рассчитанное количество клеток человека в исследуемом образце более 500 в реакцию	ДНК выявляемых ВПЧ не обнаружена
Менее 3 lg (ВПЧ на 10^5 клеток человека)	Суммарная концентрация ВПЧ<3 lg, низкий риск развития дисплазии
Выше 3 lg (ВПЧ на 10^5 клеток человека)	Суммарная концентрация ВПЧ≥3 lg, высокий риск развития дисплазии

Таблица 10

Результаты для контролей

Контроль	Результаты амплификации по каналу для флуорофора			
	FAM	R6G/ HEX /JOE/VIC	ROX	Cy5
ОК (отрицательный контроль экстракции)	Значение Ct отсутствует			
К- (отрицательный контроль ПЦР)	Значение Ct отсутствует			
К1 ВПЧ скрининг (К1)	Определено значение Ct			
К2 ВПЧ скрининг (К2)	Определено значение Ct не выше граничного[7]			
К1 ВПЧ скрининг (К1) К2 ВПЧ скрининг (К2)	Показатель эффективности (Е) для калибраторов укладывается в диапазон 0,8 – 1,2			

[7] Граничные значения Ct указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

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

8.6. Возможные ошибки

8.6.1. Для отрицательного контроля (ОК или К-) по каналу для флуорофора FAM, R6G, ROX и Cy5 определено значение порогового цикла (Ct). Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК анализируемых ВПЧ, начиная с этапа экстракции ДНК.

8.6.2. Если показатель эффективности Е для калибраторов не укладывается в диапазон 0,8 – 1,2, необходимо проверить правильность заданных концентраций калибраторов в соответствии с вкладышем к набору реагентов и правильность выбранного уровня пороговой линии. Если при правильно заданных концентрациях калибраторов и уровне пороговой линии показатель эффективности не укладывается в требуемый диапазон, следует повторить исследование, начиная с этапа ПЦР.

8.6.3. 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.

8.6.4. В случае получения невалидных результатов требуется повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести забор и исследование биологического материала.

8.7. Диагностическое значение полученного результата

ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента. Результаты, полученные при использовании набора, следует рассматривать и интерпретировать в сочетании с данными других клинических и лабораторных исследований.

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

9. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

9.1. Предел обнаружения[8]

Предел обнаружения набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» был определен с использованием пробит-анализа с 95%-ой доверительной вероятностью (см. таблицу 11).

Значения характеристики, указанные в таблице 11, достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

Таблица 11

Предел обнаружения набора

Тип ВПЧ	Предел обнаружения по Probit 95%, копий/мл	95%-ый доверительный интервал, копий/мл
ВПЧ ВКР 16	$5x10^3$	$2,95x10^3 – 7,07x10^3$
ВПЧ ВКР 18	$5x10^3$	$2,63x10^3 – 5,49x10^3$
ВПЧ ВКР 31	$5x10^3$	$3,24x10^3 – 8,11x10^3$
ВПЧ ВКР 33	$5x10^3$	$2,73x10^3 – 6,61x10^3$
ВПЧ ВКР 35	$5x10^3$	$2,77x10^3 – 6,52x10^3$
ВПЧ ВКР 39	$5x10^3$	$2,72x10^3 – 6,62x10^3$
ВПЧ ВКР 45	$5x10^3$	$2,69x10^3 – 5,62x10^3$
ВПЧ ВКР 51	$5x10^3$	$3,07x10^3 – 7,57x10^3$
ВПЧ ВКР 52	$5x10^3$	$2,72x10^3 – 6,62x10^3$
ВПЧ ВКР 56	$5x10^3$	$2,92x10^3 – 7,27x10^3$
ВПЧ ВКР 58	$5x10^3$	$2,52x10^3 – 5,99x10^3$
ВПЧ ВКР 59	$5x10^3$	$2,92x10^3 – 7,27x10^3$
ВПЧ ВКР 66	$5x10^3$	$2,89x10^3 – 7,06x10^3$
ВПЧ ВКР 68	$5x10^3$	$2,53x10^3 – 5,31x10^3$

9.2. Линейный диапазон измерения и предел измерения

Диапазон, в котором набор дает линейный ответ, находится в пределах от $8x10^3$ до $3x10^8$ копий/мл. Предел измерения набора является нижним пределом линейного диапазона измерения набора. Указанные значения характеристики достигаются при соблюдении правил, указанных в разделе «Исследуемый материал».

9.3. Аналитическая специфичность

Набор реагентов «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» обнаруживает фрагменты ДНК ВПЧ ВКР типов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.

Аналитическая специфичность набора оценивалась тестированием ДНК микроорганизмов (см. таблицу 12) и геномной ДНК человека. ДНК микроорганизмов в концентрации не менее $1x10^6$ копий/мл и геномную ДНК человека вносили в образцы биологического материала, не содержащие определяемые с помощью набора

[8] Предел обнаружения – 95%-ое положительное пороговое значение концентрации (концентрация ДНК ВПЧ ВКР, при которой 95% тестов дают положительный результат).

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

типы ВПЧ. Дополнительно подтверждалось отсутствие перекрестных реакций между выявляемыми типами ВПЧ.

Таблица 12

Микроорганизмы, используемые для оценки аналитической специфичности

Микроорганизм	Микроорганизм
Candida albicans	*Neisseria meningitides*
Candida glabrata	*Staphylococcus saprophyticus*
Candida krusei	*Staphylococcus agalactiae*
Chlamydia trachomatis	*Staphylococcus aureus*
Escherichia coli	*Shigella flexneri*
Enterobacter aerogenes	*Shigella sonnei*
Enterobacter cloacae	*Salmonella typhi*
Haemophilus influenza	*Salmonella enteritidis*
Listeria monocytogenes	*Salmonella abony*
Mycoplasma genitalium	*Pseudomonas aeruginosa*
Neisseria gonorrhoeae	–

При тестировании образцов ДНК вышеперечисленных микроорганизмов и геномной ДНК человека с использованием набора перекрестных реакций выявлено не было.

9.4. Воспроизводимость и повторяемость измерения

Воспроизводимость и повторяемость измерений с помощью набора оценивали путем тестирования модельных образцов биологического материала, содержащих ДНК выявляемых типов ВПЧ в трех диапазонах концентраций (см. таблицу 13 и 14). Модельные образцы были приготовлены разведением стандартных образцов предприятия, содержащих ДНК выявляемых типов ВПЧ, в биологическом материале, не содержащем ДНК выявляемых типов ВПЧ. Каждый образец проходил все этапы исследования (экстракцию ДНК, амплификацию ДНК и детекцию результатов).

Тестирование каждого разведения для оценки повторяемости проводилось в 16 повторах, для оценки воспроизводимости – в 32 повторах.

Таблица 13

Повторяемость измерения

Тип ВПЧ	Исходное значение концентрации, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log_{10}	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
ВПЧ 16	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,15	0,08	1,33
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,18	0,03	0,66
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,24	0,06	1,37
ВПЧ 18	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,18	0,08	1,28
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,19	0,03	0,61

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

Тип ВПЧ	Исходное значение концентрации, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log_{10}	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,19	0,09	2,04
ВПЧ 45	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,14	0,10	1,67
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,21	0,07	1,31
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,21	0,07	1,70
ВПЧ 35	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,20	0,08	1,21
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,23	0,10	1,92
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,20	0,08	1,96
ВПЧ 68	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,06	0,06	0,93
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,08	0,07	1,38
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,14	0,09	2,08
ВПЧ 59	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,19	0,11	1,71
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,23	0,09	1,78
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,24	0,07	1,63
ВПЧ 51	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,21	0,08	1,38
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,23	0,08	1,46
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,25	0,08	1,91
ВПЧ 58	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,23	0,08	1,23
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,21	0,11	2,03
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,20	0,10	2,39
ВПЧ 52	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,23	0,10	1,53
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,14	0,09	1,83
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,20	0,09	2,21
ВПЧ 33	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,06	0,04	0,71
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,07	0,04	0,74
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,26	0,02	0,45
ВПЧ 56	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,22	0,11	1,75
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,03	0,02	0,49
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,25	0,01	0,35
ВПЧ 39	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,09	0,07	1,15
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,07	0,05	0,97
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,17	0,07	1,59
ВПЧ 31	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,16	0,07	1,20
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,14	0,07	1,44
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,19	0,10	2,36
ВПЧ 66	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,21	0,10	1,61
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,06	0,04	0,88
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,20	0,07	1,70

Таблица 14

Воспроизводимость измерения

Тип ВПЧ	Исходное значение концентрации, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log_{10}	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
ВПЧ 16	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,24	0,09	1,43
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,27	0,08	1,51
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,09	0,11	2,60
ВПЧ 18	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,15	0,09	1,44
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,16	0,07	1,40
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,25	0,09	2,14
ВПЧ 45	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,32	0,18	2,81
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,33	0,18	3,34
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,56	0,14	3,12
ВПЧ 35	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,39	0,14	2,24
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,41	0,08	1,45

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

Тип ВПЧ	Исходное значение концентрации, копий/мл	Среднее измеренное значение концентрации, log_{10}	Стандартное отклонение (SD), log_{10}	Коэффициент вариации (CV), %
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,48	0,15	3,36
ВПЧ 68	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,16	0,13	2,04
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,09	0,06	1,19
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	3,99	0,30	7,47
ВПЧ 59	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,65	0,25	3,76
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,60	0,13	2,38
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,62	0,13	2,78
ВПЧ 51	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,68	0,14	2,08
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,70	0,18	3,14
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,62	0,11	2,28
ВПЧ 58	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,56	0,26	3,93
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,54	0,11	2,06
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,52	0,18	4,02
ВПЧ 52	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,45	0,15	2,27
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,52	0,19	3,50
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,57	0,15	3,27
ВПЧ 33	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,09	0,06	1,01
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,06	0,04	0,74
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,01	0,10	2,56
ВПЧ 56	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,34	0,16	2,58
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,30	0,20	3,69
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,21	0,26	6,14
ВПЧ 39	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,36	0,22	3,40
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,10	0,14	2,73
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,12	0,28	6,82
ВПЧ 31	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,52	0,26	4,01
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,54	0,21	3,71
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,49	0,27	6,02
ВПЧ 66	от $1x10^6$ до $2x10^6$	6,41	0,18	2,76
	от $1x10^5$ до $2x10^5$	5,37	0,26	4,81
	от $1x10^4$ до $2x10^4$	4,23	0,25	5,95

9.5. Правильность измерения

Правильность измерения с помощью набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» была определена путем тестирования стандартных образцов предприятия в 32 повторах (см. таблицу 15).

Таблица 15

Правильность измерения

Тип ВПЧ	Среднее значение измерения, log_{10}	Установленное значение концентрации, log_{10}	Систематическая погрешность (B)	
			log_{10}	%
ВПЧ 16	5,47	5,70	-0,23	-3,97
ВПЧ 18	5,55	5,70	-0,15	-2,68
ВПЧ 45	5,44	5,70	-0,26	-4,48
ВПЧ 35	5,19	5,70	-0,51	-8,89
ВПЧ 68	4,89	5,70	-0,81	-14,15
ВПЧ 59	5,22	5,70	-0,48	-8,37
ВПЧ 51	5,52	5,70	-0,18	-3,17
ВПЧ 58	5,46	5,70	-0,24	-4,23

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

Тип ВПЧ	Среднее значение измерения, log_{10}	Установленное значение концентрации, log_{10}	Систематическая погрешность (B)	
			log_{10}	%
ВПЧ 52	5,23	5,70	-0,47	-8,19
ВПЧ 33	5,25	5,70	-0,45	-7,97
ВПЧ 56	5,23	5,70	-0,47	-8,26
ВПЧ 39	5,23	5,70	-0,47	-8,28
ВПЧ 31	5,63	5,70	-0,07	-1,22
ВПЧ 66	5,35	5,70	-0,35	-6,20

9.6. Диагностическая специфичность и диагностическая чувствительность

Для определения диагностических характеристик набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» были использованы 500 образцов отделяемого слизистой оболочки влагалища (мазки) (в транспортной среде для мазков), 200 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (в транспортной среде для мазков), 500 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для жидкостной цитологии (в том числе с гистологически подтвержденной дисплазией средней степени и выше (CIN2+)), 200 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки уретры (мужские образцы), 195 образцов соскобов эпителия со слизистой оболочки прямой кишки.

В качестве наборов сравнения, с помощью которых устанавливали наличие или отсутствие ДНК ВПЧ ВКР, использовались следующие наборы реагентов:

– Набор реагентов для количественного определения ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 генотипов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики *in vitro* «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» по ТУ 9398-231-01897593-2015 (РУ № РЗН 2017/5387),

– Набор реагентов для дифференциального выявления и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК ВПЧ ВКР генотип количественный) по ТУ 9398-320-23548172-2011 (РУ № ФСР 2012/13457),

– Набор реагентов для выявления ДНК вируса папилломы человека 66 типа методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК ВПЧ 66) по ТУ 9398-512-23548172-2015 (РУ № РЗН 2016/4013),

– Набор реагентов для выявления ДНК вируса папилломы человека 68 типа методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РеалБест ДНК ВПЧ 68) по ТУ 9398-426-23548172-2013 (РУ № РЗН 2015/2297).

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

Таблица 16

Результаты тестирования образцов биологического материала с помощью набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14»

Исследуемые образцы		Результаты тестирования		
Тип	**Количество**	**Образцы**	**АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14**	**Набор сравнения**
Отделяемое слизистой оболочки влагалища (мазок) в транспортной среде для мазков	500	Положительных	149	149
		Отрицательных	351	351
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для мазков	200	Положительных	101	101
		Отрицательных	99	99
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для жидкостной цитологии (в том числе с гистологически подтвержденной дисплазией средней степени и выше (CIN2+))	500	Положительных	162	162
		Отрицательных	338	338
Соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры (мужские образцы)	200	Положительных	101	101
		Отрицательных	99	99
Соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки	195	Положительных	98	98
		Отрицательных	97	97

Значения диагностической специфичности и чувствительности набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» с доверительной вероятностью 95 %, рассчитанные, исходя из полученных данных, приведены в таблице 17.

Таблица 17

Диагностические характеристики набора

Тип образцов	Диагностическая специфичность, %	Диагностическая чувствительность, %
Отделяемое слизистой оболочки влагалища (мазок) в транспортной среде для мазков	99,2 – 100	98,0 – 100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для мазков	97,0 – 100	97,1 – 100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала в транспортной среде для жидкостной цитологии	99,1 – 100	98,2 – 100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры (мужские образцы)	97,0 – 100	97,1 – 100
Соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки	97,0 – 100	97,0 – 100

9.7. Оценка влияния интерферирующих веществ и ДНК человека

Влияние интерферирующих веществ, потенциально содержащихся или присутствующих в исследуемом биоматериале, на эффективность ПЦР при использовании набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» отсутствует. Не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам отделяемого слизистой оболочки влагалища и образцам отделяемого слизистой оболочки прямой

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

кишки на этапе экстракции интерферирующих веществ, представленных в таблице 18, в максимально возможной концентрации для данных видов биоматериала.

Таблица 18

Вид биоматериала	Интерферент	Концентрация интерферента в образце
отделяемое слизистой оболочки влагалища	муцин	0,23 мг/100 мкл
	гемоглобин	0,20 ммоль/100 мкл
	мочевина	0,033 ммоль/100 мкл
	лубриканты	5 мкг/100 мкл
	семенная жидкость	5 мкг/100 мкл
	мирамистин	0,001 % действующего вещества
	итраконазол	6,5 мкг/100 мкл
	метронидазол	5 мкг/100 мкл
	дидрогестерон	5 мкг/100 мкл
	прогестерон	5 мкг/100 мкл
отделяемое слизистой оболочки прямой кишки	гликохолат натрия	11,1 нг/100 мкл
	натрий таурохолат гидрат	3,8 нг/100 мкл
	хлорофилл	0,26 мкг/100 мкл

Также при использовании набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» не выявлено ингибирование реакции амплификации при добавлении к образцам отделяемого слизистой оболочки влагалища искусственно-синтезированной ДНК человека в максимально возможной концентрации ($3{,}0 \times 10^6$ копий/100 мкл) для данного вида биоматериала.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Срок годности

Срок годности набора составляет 12 месяцев от даты изготовления. После вскрытия реагенты использовать до истечения срока годности набора. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.2. Транспортирование

Набор транспортировать при температуре от 2 до 8 °С всеми видами крытых транспортных средств в термоконтейнерах с хладоэлементами или в авторефрижераторах. Не допускается замораживание реагентов.

Допускается транспортирование при температуре от 8 до 25 °С не более 3 суток.

Набор, транспортированный с нарушением указанного температурного режима, применению не подлежит.

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

10.3. Хранение

Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора. Не допускается замораживание реагентов.

Реагенты после вскрытия хранить в тех же условиях, что и реагенты до вскрытия. Невскрытые и вскрытые реагенты стабильны в течение срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении указанных условий хранения. Реакционная смесь, приготовленная из ПЦР-смеси ВПЧ-скрининг и Буфера В, хранению не подлежит.

Набор, хранившийся с нарушением указанного режима хранения, применению не подлежит.

11.ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» направлять в адрес производителя ООО «НекстБио»: 111394, г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр. 2, тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru.

При выявлении нежелательных реакций при использовании набора, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при обращении и эксплуатации набора, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в Российской Федерации – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Консультацию по работе с набором, а также по вопросам, касающимся качества набора, можно получить по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: www.nextbio.ru.

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

12. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДОКУМЕНТАЦИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

	Номер по каталогу		Изготовитель
	Код партии		Дата изготовления
	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*		Использовать до
	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению		Не допускать попадания солнечного света

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

УТВЕРЖДАЮ
Директор по развитию
ООО «НекстБио»
_____ Е. А. Новоселова
22.10.2019

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 ТИПОВ ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» «АМПЛИПРАЙМ® ВПЧ ВКР 14» ПО ТУ 21.20.23-037-09286667-2019

Краткое руководство по применению версии 01.10.19

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Руководитель отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»
_____ М. Н. Гарас
02.10.2019

Старший специалист по документации отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»
_____ Ю. А. Дарикова
01.10.2019

Директор научно-производственного комплекса ООО «НекстБио»
_____ М. Е. Сенина
02.10.2019

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

IVD

АмплиПрайм

Краткое руководство

по применению набора реагентов для качественного и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» по ТУ 21.20.23-037-09286667-2019

«АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14»

REF X

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2
тел. (495) 620-08-73, e-mail:info@nextbio.ru

ВНИМАНИЕ!

Перед использованием набора реагентов необходимо ознакомиться с инструкцией по его применению. Инструкция размещена в электронном виде на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru/reagents/, а также на USB флэш-накопителе.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

- ✓ мазки со слизистой оболочки влагалища (помещенные в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (помещенный в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки цервикального канала (помещенный в транспортную среду для жидкостной цитологии);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки уретры (помещенный в транспортную среду с муколитиком);
- ✓ соскоб эпителия со слизистой оболочки прямой кишки.

СОСТАВ

Компонент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь ВПЧ-скрининг	Прозрачная жидкость	1,10	1 пробирка
Буфер В		0,60	1 пробирка
К1 ВПЧ скрининг		0,12	1 пробирка
К2 ВПЧ скрининг		0,12	1 пробирка
ОКО		1,10	1 пробирка
К–	Прозрачная жидкость	0,26	1 пробирка
Программное обеспечение «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО» версия 1.0	На USB флэш-накопителе		
Набор реагентов рассчитан на проведение исследования 100 образцов, включая контроли.			

КОМПЛЕКТНОСТЬ

Компонент	Формат
Набор реагентов	-
Инструкция по применению	в электронном виде на USB флэш-накопителе и по адресу: http://www.nextbio.ru/reagents/
Паспорт качества	в электронном виде по адресу: http://www.nextbio.ru/passport/
Краткое руководство	в бумажном виде
Вкладыш	в бумажном виде
Руководство оператора	в электронном виде на USB флэш-накопителе и по адресу: http://www.nextbio.ru/reagents/

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения набора
2°С … 8°С в защищенном от света месте

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

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для экстракции ДНК использовать наборы реагентов, рекомендованные Производителем в инструкции по применению набора «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14». Порядок работы с наборами для экстракции ДНК смотрите в инструкции по их применению.

Объемы реагентов и исследуемых образцов, используемые при экстракции ДНК с помощью рекомендуемых наборов реагентов, указаны в таблице ниже.

Добавляемый реагент / образец		
Исследуемые образцы	100 мкл	в пробирки для исследуемых образцов
ОКО	100 мкл	в пробирку для ОК (отрицательного контроля экстракции)
Реагент для элюции ДНК	100 мкл	в каждую пробирку

АМПЛИФИКАЦИЯ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ВНИМАНИЕ! Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК и контрольных образцов использовать одноразовые наконечники с фильтрами.

1. Рассчитать объем реагентов, необходимый для приготовления реакционной смеси, согласно таблице:

Реагент	**Объем, мкл**	**Обозначения**
ПЦР-смесь ВПЧ-скрининг	**10,0***(N+1)	**N** – количество образцов ДНК, полученных на этапе экстракции, включая контроли
Буфер В	**5,0***(N+1)	

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением ПЦР.

ВНИМАНИЕ! В случае приготовления реакционной смеси с помощью автоматической станции следуйте указаниям инструкции по ее использованию.

2. Перед смешиванием реагентов перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью ВПЧ-скрининг и Буфером В, осадить капли на вортексе.
3. Приготовить реакционную смесь в отдельной пробирке, добавив компоненты в объемах, рассчитанных в п. 1. Перемешать смесь и осадить капли на вортексе.
4. Отобрать необходимое количество пробирок или стрипов для амплификации ДНК исследуемых и контрольных образцов, полученной на этапе экстракции.
5. Внести в подготовленные пробирки реакционную смесь и образцы согласно таблице:

Добавляемый реагент / образец	
Внести по 15 мкл	
Приготовленной реакционной смеси	в пробирки для исследуемых и контрольных образцов
Внести по 10 мкл	
ВНИМАНИЕ! Избегать попадания сорбента в реакционную смесь.	
Пробы ДНК, экстрагированной из исследуемого образца	в пробирки для исследуемых образцов
Пробы ДНК, экстрагированной из ОКО	в пробирку для образца ОК (отрицательного контроля экстракции)
Реагента К–	в пробирку для образца К– (отрицательного контроля ПЦР)
К2 ВПЧ скрининг *(при проведении качественного и количественного анализа)*	в пробирку для образца К2
К1 ВПЧ скрининг *(при проведении только количественного анализа)*	в пробирку для образца К1

6. Запрограммировать амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени» согласно инструкции по его применению для выполнения следующей программы:

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

Единая программа амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Цикл	Температура, °С	Время	Детекция по каналам для флуорофоров	Количество циклов
1	50	15 мин	–	1
2	95	15 мин	–	1
3	95	10 с	–	45
	60	20 с	FAM, R6G[1], ROX, Cy5	

Примечания

1) Рекомендуемые параметры для программирования амплификаторов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

2) В случае, если в одном приборе одновременно проводятся тесты только для выявления ДНК, можно удалить из указанной программы первый шаг (50 °С – 15 мин) для экономии времени.

7. Установить пробирки или стрипы в ячейки реакционного модуля прибора.

Примечание - Рекомендуется перед постановкой в амплификатор планшетного типа осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

8. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала согласно инструкции по применению используемого амплификатора.

АНАЛИЗ, ВЫЧИСЛЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

ВНИМАНИЕ! Обработку данных (флуоресцентных кривых), полученных в программном обеспечении прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», проводить согласно инструкции по его применению. Рекомендуемые параметры для обработки данных указаны во вкладыше, прилагаемом к набору.

Анализ, вычисление и интерпретацию результатов можно проводить:

- в качественном и количественном формате в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения к набору «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО» версии 1.0 согласно руководству оператора по применению программного обеспечения. Руководство оператора и программное обеспечение находятся на USB флэш-накопителе, входящем в состав набора, а также на официальном сайте Производителя по адресу: http://www.nextbio.ru/reagents/. Необходимые значения для расчета результатов указаны во вкладыше, прилагаемом к набору;
- в качественном формате в ручном режиме с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени», согласно инструкции по его применению и инструкции к набору.

[1] Детекция сигнала для флуорофора R6G осуществляется по каналу детекции для аналогичных флуорофоров HEX, JOE, VIC.

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

Пронумеровано, скреплено и прошито
4 лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстБио»

О.О. Лавинюков

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

УТВЕРЖДАЮ
Директор по развитию
ООО «НекстБио»
_____ Е. А. Новоселова
22.10.2019

ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ И ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

«АМПЛИПРАЙМ® ВПЧ ВКР 14 ПО» ВЕРСИЯ 1.0

Руководство оператора версии 01.10.19

Лист утверждения

СОГЛАСОВАНО

Руководитель отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»
_____ М. Н. Гарас
02.10.2019

Старший специалист по документации отдела разработки производственной документации ООО «НекстБио»
_____ Ю. А. Дарикова
01.10.2019

Директор научно-производственного комплекса ООО «НекстБио»
_____ М. Е. Сенина
02.10.2019

2019

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

АмплиПрайм

IVD

Программное обеспечение для автоматической обработки исходных данных и получения результатов

«АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО» версия 1.0

РУКОВОДСТВО ОПЕРАТОРА

2019

ООО «НекстБио», Россия, 111394,
г. Москва, ул. Полимерная, д. 8, стр. 2,
тел. (495) 620-08-73, e-mail: info@nextbio.ru

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

АННОТАЦИЯ

Настоящий документ представляет собой руководство оператора по применению программного обеспечения «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО» версии 1.0 (далее по тексту – ПО), предназначенного для автоматической обработки исходных данных и результатов, полученных при применении набора реагентов «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14».

В данном программном документе описан принцип работы ПО, определены условия, необходимые для его успешного функционирования, указана последовательность действий оператора при запуске и работе с ПО, приведены системные сообщения, выдаваемые в ходе работы с ПО, и соответствующие действия оператора при их получении.

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

СОДЕРЖАНИЕ

АННОТАЦИЯ 2
СОДЕРЖАНИЕ 3
1. НАЗНАЧЕНИЕ ПРОГРАММЫ 5
2. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ 5
3. ПРИНЦИП РАБОТЫ 6
4. ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ 6
4.1. Загрузка и запуск программы 6
4.2. Обновление программы 6
4.3. Выполнение программы 7
4.4. Сохранение результатов анализа и расчета 12
4.5. Завершение работы программы 13
5. СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ 13
5.1. Статус контрольных образцов 13
5.2. Статус исследуемых образцов 18
6. ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА 18

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ct	–	Cycle threshold (пороговый цикл)
ВПЧ	–	вирус папилломы человека
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
К1	–	калибратор 1 (положительный контроль)
К2	–	калибратор 2 (положительный контроль)
ОК	–	отрицательный контроль
ПО	–	программное обеспечение

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ ПРОГРАММЫ

Программное обеспечение «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО» версии 1.0 предназначено для автоматической обработки исходных данных и получения формализованных результатов при использовании набора реагентов для качественного и количественного определения ДНК вирусов папилломы человека 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов высокого канцерогенного риска методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме «реального времени» «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14» по ТУ 21.20.23-037-09286667-2019.

ПО позволяет проводить автоматическую обработку и анализ исходных данных, полученных в программном обеспечении используемого амплификатора с детекцией в режиме «реального времени», а также автоматическую интерпретацию результатов и формировать бланк с формализованными результатами.

ПО предназначено для работы на персональных компьютерах в учреждениях медицинского профиля (клинико-диагностических лабораториях), применяющих в своей работе набор реагентов «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14».

ПО предоставляется на USB флэш-накопителе в составе набора реагентов «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14», а также в электронном виде на официальном сайте Производителя по адресу: http://www.nextbio.ru/reagents/.

2. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ

2.1. Минимальный состав технических средств

Минимальный состав используемых технических средств включает:

a. Компьютер со следующими характеристиками:
   - Операционная система Windows 7 и выше;
   - Оперативная память объемом не менее 2 Гб;
   - Процессор с тактовой частотой не менее 1,5 ГГц.
b. Устройство для вывода бланка с результатами на печать (опционально).

2.2. Минимальный состав программных средств

Минимальный состав используемых программных средств включает:

a. Операционную систему Windows 7 и выше;
b. Microsoft .NET Framework 4.5 и выше;

2.3. Требования к пользователю (оператору)

Пользователями ПО (операторами) должны являться сотрудники клинико-диагностической лаборатории, обладающие практическими навыками работы с персональным компьютером.

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

3. ПРИНЦИП РАБОТЫ

В качестве исходных данных ПО использует значения порогового цикла амплификации (Ct) исследуемых образцов и контролей по соответствующим каналам для флуорофоров.

Для начала работы исходные данные должны быть получены в программном обеспечении используемого прибора, в соответствии с инструкцией по применению к используемому прибору.

Поля вкладки ПО «Параметры» заполняют значениями из вкладыша к используемой серии набора реагентов «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14». Далее значения порогового цикла (Ct) по каждому каналу флуоресцентной детекции размещают во вкладке ПО «Расчет результатов» в соответствующих столбцах таблицы «Данные прибора».

После нажатия кнопки «Расчет результатов» ПО автоматически проводит расчет концентрации специфических мишеней, оценку полученных значений для контрольных образцов в соответствии с заданными критериями и интерпретацию результатов.

4. ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОГРАММЫ

4.1. Загрузка и запуск программы

Запустить инсталлятор ПО, находящийся на USB флэш-накопителе[1] или загруженный с официального сайта Производителя по ссылке: http://www.nextbio.ru/reagents/. Следовать указаниям в появившемся окне Мастера установки. После установки ПО на рабочем столе автоматически будет создан ярлык (рис. 1).



Рисунок 1

Для запуска программы необходимо запустить ярлык с рабочего стола.

4.2. Обновление программы

После запуска ПО автоматически проверяет наличие обновления. В случае если обновление доступно, предлагается его загрузить и установить (рис. 2).

[1] Поставляется в составе набора реагентов «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14».

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

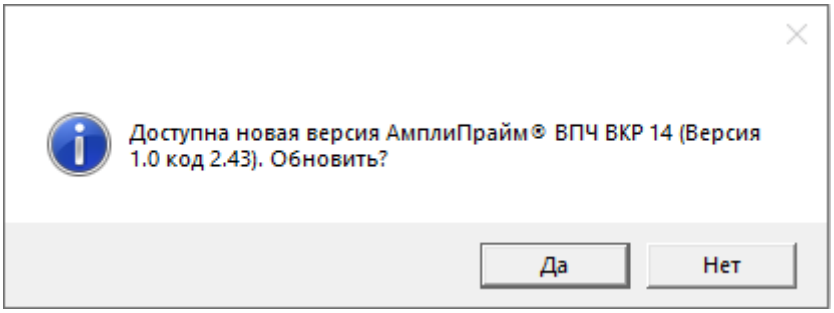


Рисунок 2

При нажатии кнопки «Да» будет загружен инсталлятор с обновлением, по окончании загрузки будет выдано сообщение о готовности обновления к установке (рис. 3).

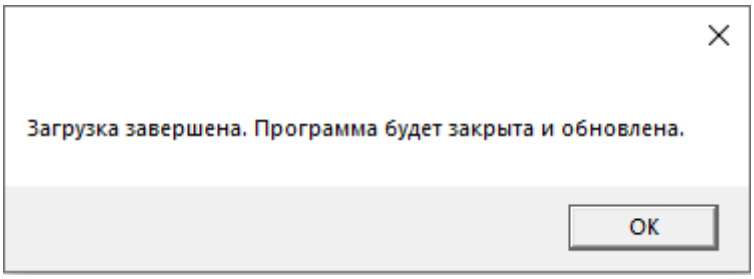


Рисунок 3

После нажатия кнопки «ОК» программа закроется, и инсталлятор с обновлением будет запущен. Для установки обновления ПО необходимо следовать указаниям Мастера установки.

4.3. Выполнение программы

Для проведения анализа исходных данных необходимо внести значения во вкладку «Параметры» и в таблицу «Данные прибора» во вкладке «Расчет результатов».

4.3.1. Заполнение таблицы «Параметры»

Пустые поля таблицы «Параметры» (рис. 4) должны быть заполнены в соответствии с вкладышем к используемой серии набора реагентов «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14».

Параметры

	Green FAM	Yellow R6G	Orange ROX	Red Cy5
Концентрации калибраторов, копии/реакцию				
K1 (ВПЧ скрининг)	500000	500000	500000	500000
K2 (ВПЧ скрининг)	1000	1000	1000	1000
Граничные значения порогового цикла (Ct)				
ОК (ВПЧ скрининг)	—	—	—	—
K2 (ВПЧ скрининг)				
Исследуемые образцы (ВПЧ скрининг)	—	—	—	

Рисунок 4

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

4.3.2. Заполнение таблицы «Данные прибора»

Для проведения корректной обработки данных заполнение таблицы «Данные прибора» (рис. 5) во вкладке «Расчет результатов» должно проводиться без ошибок.

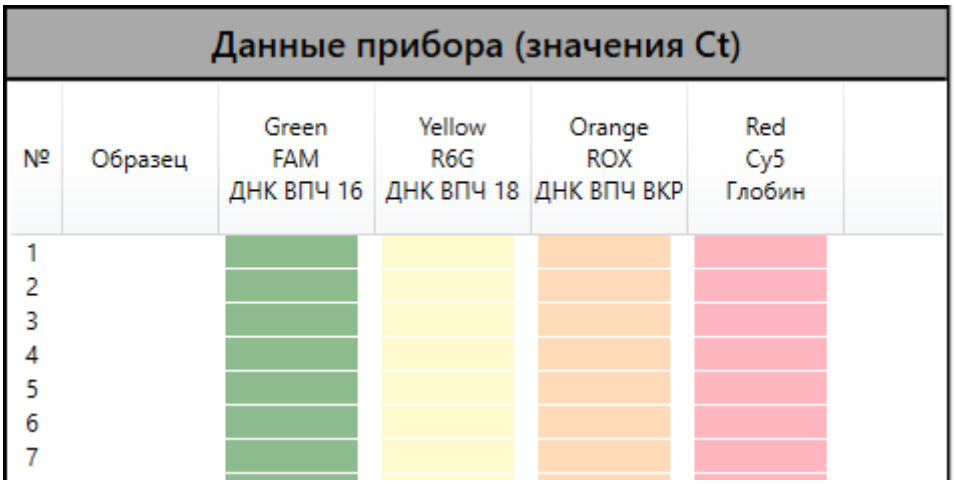


Рисунок 5

Столбцы таблицы следует заполнять путем копирования данных (значений Ct) непосредственно из программного обеспечения прибора, используемого для проведения амплификации и детекции флуоресцентного сигнала, либо из файла экспорта данных в Microsoft Excel, соблюдая при этом соответствие каналов для флуорофоров.

В ПО предусмотрено копирование данных без заголовков столбцов. Для этого используется кнопка «Игнорировать заголовки столбцов при копировании» (рис. 6).



Рисунок 6

По умолчанию функция копирования данных без заголовков столбцов включена. Если изначально возможно внесение данных без заголовков столбцов, функцию необходимо отключить путем нажатия кнопки (рис. 6), чтобы избежать потери данных для первого образца.

В столбец «Образец» необходимо внести обозначения исследуемых и контрольных образцов. Обозначение контрольных образцов вносить строго в соответствии с таблицей 1. В случае правильного обозначения контролей цвет их названия меняется с черного на синий.

Таблица 1

Обозначение контрольных образцов

Контрольный образец	Возможные обозначения
Отрицательный контроль (используется в каждой постановке)	РУС: ОК / ок / ОКО / око
Положительный контроль Калибратор 1 (используется в каждой постановке)	К1 или к1

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

Контрольный образец	Возможные обозначения
Положительный контроль Калибратор 2 (используется в каждой постановке)	К2 или к2

Рекомендации по импортированию данных из ПО амплификатора QuantStudio 5

Для удобства копирования данных из программного обеспечения амплификатора QuantStudio 5 в АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО рекомендуется использовать Microsoft Excel. Для этого необходимо следующее:

1. Образцы должны располагаться в лунках амплификатора следующим образом: образец №1 – A1, образец №2 – A2, образец №3 – A3 и т.д.;

2. В настройках ПО прибора («Export» => «Customize» => «Results») необходимо включить выгрузку колонок «Well», «Well Position», «Sample Name», «Reporter», «CT», как показано на рис. 7. Экспортировать данные в Microsoft Excel.

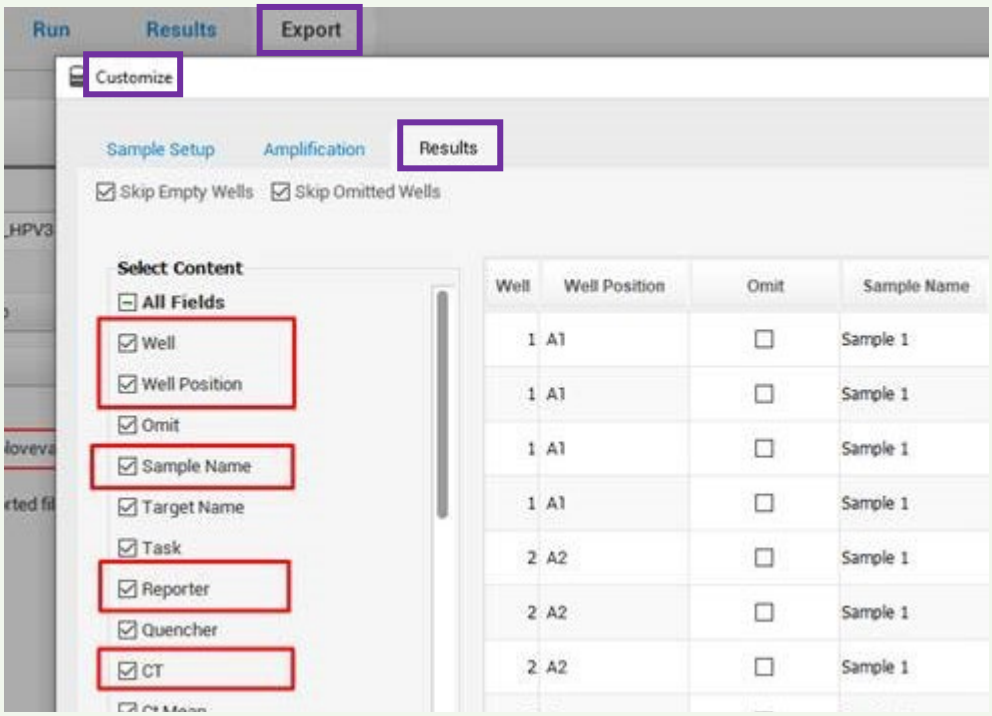


Рисунок 7

3. В сохраненном файле в формате .xls (.xlsx) необходимо выбрать вкладку «Results». Затем выделить всю таблицу с полученными значениями Ct, как указано на рис. 8, во вкладке «Главная» выбрать «Сортировка и фильтр»=>«Настраиваемая сортировка» или во вкладке «Данные» выбрать «Сортировка». Далее, в выпадающем меню, «Сортировать по» выбрать «Target Name», затем «Добавить уровень» и в выпадающем меню «Сортировать по» второй строкой выбрать «Well» затем «Добавить уровень» и в выпадающем меню «Сортировать по» третьей строкой «Well Position» (рис. 9), нажать «ОК».

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

Well	Well Positi	Sample Na	Target Nar	Task	Reporter	CT
1	A1	Sample 1	Target 1	UNKNOWI	FAM	Undetermined
1	A1	Sample 1	Target 2	UNKNOWI	VIC	Undetermined
1	A1	Sample 1	Target 3	UNKNOWI	ROX	24,862
1	A1	Sample 1	Target 4	UNKNOWI	CY5	23,054
2	A2	Sample 1	Target 1	UNKNOWI	FAM	Undetermined
2	A2	Sample 1	Target 2	UNKNOWI	VIC	Undetermined
2	A2	Sample 1	Target 3	UNKNOWI	ROX	23,138
2	A2	Sample 1	Target 4	UNKNOWI	CY5	22,662
3	A3	Sample 1	Target 1	UNKNOWI	FAM	Undetermined
3	A3	Sample 1	Target 2	UNKNOWI	VIC	27,753
3	A3	Sample 1	Target 3	UNKNOWI	ROX	33,657
3	A3	Sample 1	Target 4	UNKNOWI	CY5	23,539
4	A4	Sample 1	Target 1	UNKNOWI	FAM	Undetermined
4	A4	Sample 1	Target 2	UNKNOWI	VIC	Undetermined
4	A4	Sample 1	Target 3	UNKNOWI	ROX	21,340
4	A4	Sample 1	Target 4	UNKNOWI	CY5	23,329
5	A5	Sample 1	Target 1	UNKNOWI	FAM	Undetermined

Рисунок 8

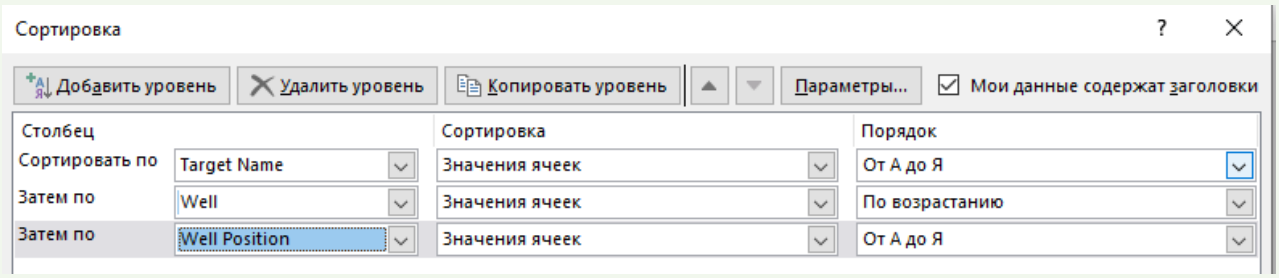


Рисунок 9

4. После сортировки последовательно скопировать значения из столбца «CT», соответствующих «Target 2», «Target 3» и «Target 4» и вставить их справа от значений «CT», соответствующих «Target 1». Выделить получившиеся 4 столбца и скопировать значения в поле «Данные прибора (значения Ct)» программы «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО», установив курсор в ячейке, соответствующей каналу FAM для ПЦР-смеси ВПЧ-1. При этом следует обратить внимание, чтобы функция «Игнорировать заголовки столбцов при копировании» была отключена, чтобы избежать потери данных для первого образца.

4.3.3. Заполнение таблицы «Информация о постановке»

В ПО предусмотрена возможность сохранять дополнительную информацию о проведении анализа. Для этого следует заполнить поля таблицы «Информация о постановке» (рис. 10) во вкладке «Расчет результатов». Открыть или свернуть таблицу возможно либо нажатием на поле «Информация о постановке» левой клавишей мыши, либо нажатием на стрелку в левой части поля «Информация о постановке».

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

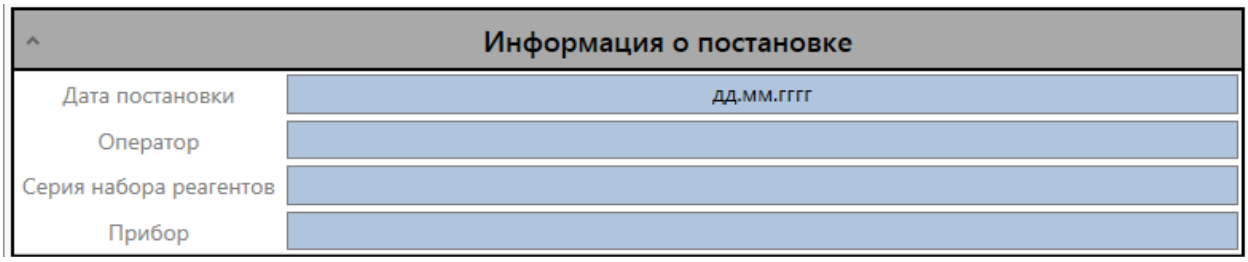


Рисунок 10

Поле «Дата постановки» автоматически заполняется текущей датой, которую можно изменить вручную.

В поле «Серия набора реагентов» следует указать серию набора реагентов «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14», использованную для проведения ПЦР-исследования образцов.

Поле «Оператор» заполняют при необходимости данными об операторе, проводящем исследование.

В поле «Прибор» вносят при необходимости информацию об использованном амплификаторе с детекцией в режиме «реального времени».

4.3.4. Выполнение функции расчета и интерпретации результатов

По окончании заполнения необходимой информации в таблицах, указанных в пунктах 4.3.1. - 4.3.3. следует произвести расчет результатов путем нажатия кнопки «Расчет результатов».

В таблице «Результаты» (рис. 11) будут отражены:

- статус валидности контрольных образцов,
- статус валидности исследуемых образцов,
- расчетные данные (количество клеток человека в образце),
- информация о наличии/отсутствии исследуемых типов ВПЧ,
- информация о риске развития дисплазии.



Рисунок 11

Во вкладке «Показать/скрыть концентрации» (рис. 11) будет отражена суммарная концентрация ВПЧ, указанная в lg копий/10^5 клеток человека. В случае отсутствия ДНК

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

выявляемых типов ВПЧ в исследуемом образце соответствующие ячейки остаются пустыми.

В случае невозможности получения для исследуемого образца количественных результатов производится качественный анализ данного образца.

После получения результатов необходимо проверить статус образцов, обращая особое внимание на контрольные образцы. Интерпретацию статуса исследуемых образцов и контролей смотрите в разделе «Сообщения оператору».

4.3.5. Выполнение функции очистки исходных данных и результатов

В случае если необходимо произвести расчет с новыми исходными данными, для очистки таблиц с внесенными исходными и расчетными данными следует воспользоваться кнопкой «Очистить данные и результаты» (рис. 12), располагающейся во вкладке «Расчет результатов».



Рисунок 12

4.4. Сохранение результатов анализа и расчета

Перед завершением работы ПО следует сохранить бланк с результатами расчета и их интерпретацией, нажав кнопку «Сохранить бланк результатов» (рис. 13), располагающуюся во вкладке «Расчет результатов», и введя имя сохраняемого файла в открывшемся диалоговом окне. Бланк результатов может быть сохранен в формате PDF или XPS.



Рисунок 13

При нажатии кнопки «Экспорт результатов» (рис. 14) во вкладке «Расчет результатов» информация будет сохранена в файле формата CSV для последующего редактирования в MS Excel.



Рисунок 14

ПО позволяет напечатать бланк с полученными результатами. Для этого необходимо нажать кнопку «Печать бланка результатов» (рис. 15) во вкладке «Расчет результатов».



Рисунок 15

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

При нажатии кнопки «Копировать результаты» (рис. 16) во вкладке «Расчет результатов» данные прибора и полученные результаты будут скопированы в буфер обмена.



Рисунок 16

4.5. Завершение работы программы

Завершение работы ПО обеспечивается стандартными средствами операционной системы. Для завершения работы ПО следует нажать кнопку «Закрыть» в правом верхнем углу окна ПО.

Если после выполнения расчета результаты не были сохранены, то при закрытии окна программы будет предложено их сохранить (рис .17). В случае положительного ответа результаты будут сохранены в файле формата CSV.

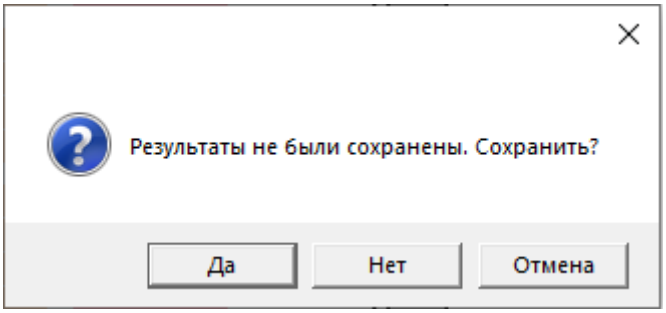


Рисунок 17

5. СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ

5.1. Статус контрольных образцов

5.1.1. Успешное прохождение контролей

ПО автоматически проверяет наличие обязательных контролей (К1, К2 и ОК) в постановке. В случае соответствия контрольных образцов заданным критериям валидности, в столбце «Статус» таблицы «Результаты» выдается сообщение «Ок».

Значение показателя эффективности (E), коэффициенты линейного уравнения регрессии (a, b) и коэффициент корреляции линейной регрессии (R^2) отображаются во вкладке «Данные калибровки». В случае соответствия контрольных образцов заданным критериям валидности в строке «Комментарий» выдается сообщение «Ок» (рис. 18).

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

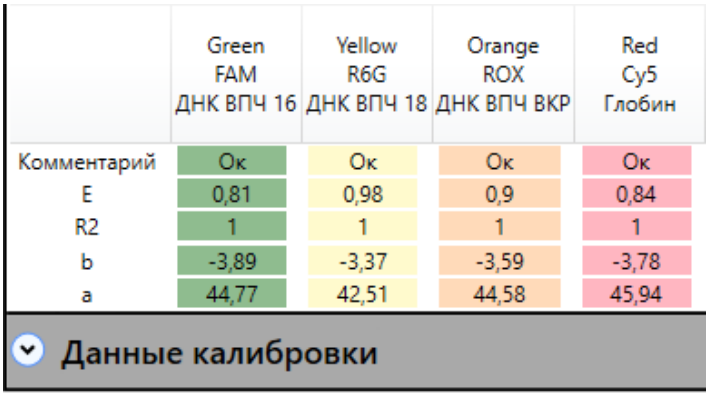


Рисунок 18

5.1.2. Отсутствие контролей

Если при проведении расчета отсутствует или обозначен неправильно обязательный контрольный образец ОК, ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 19), расчет не производится..

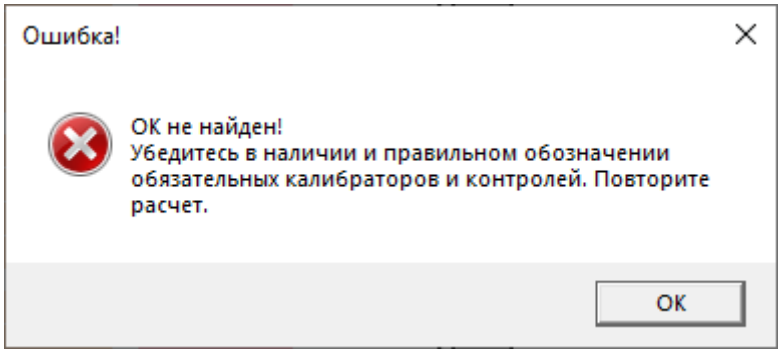


Рисунок 19

Если при проведении расчета отсутствует или обозначен неправильно обязательный контрольный образец К1, ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 20), расчет не производится.

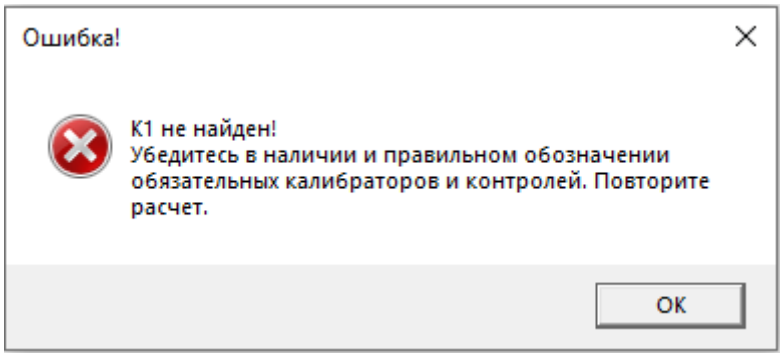


Рисунок 20

Если при проведении расчета отсутствует или обозначен неправильно обязательный контрольный образец К2, ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 21), расчет не производится.

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

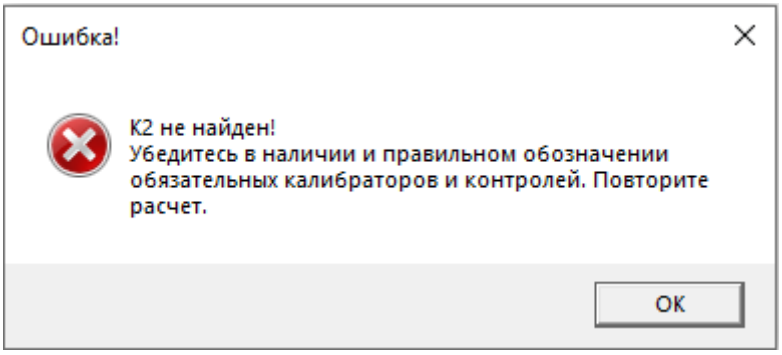


Рисунок 21

Действия оператора: Следует проверить правильность обозначения контрольных образцов. Если анализируемые образцы обозначены правильно и контроли все-таки отсутствуют, требуется провести повторное исследование всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК при отсутствии ОК или с этапа ПЦР при отсутствии К1 и/или К2.

5.1.3. Получение невалидного результата для контролей

5.1.3.1. Если контрольный образец ОК не укладывается в заданные критерии по каналу для флуорофора Cy5, расчет не производится, в столбце «Статус» для образца ОК появляется сообщение «Сбой ВКО!»

5.1.3.2. В случае если для контрольного образца ОК получены значения Ct по каналам для флуорофоров FAM и/или R6G и/или ROX и/или Cy5.5 (для всех смесей, кроме ПЦР-смеси ВПЧ-4 (ДНК ВКО)), расчет не производится. ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 22), а в таблице «Результаты» в столбце «Статус» для ОК выдается сообщение «Контаминация? …» (например, «Контаминация? 16+», «Контаминация? 18+», «Контаминация? ВКР+»).

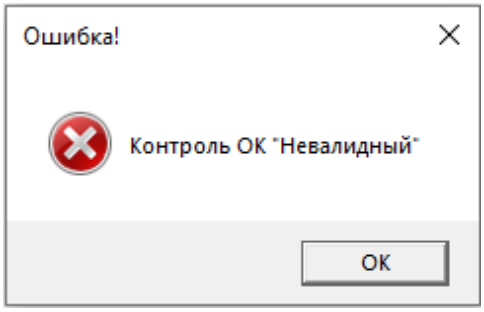


Рисунок 22

Действия оператора: Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов или исследуемых образцов другими образцами или продуктами амплификации на каком-либо этапе исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, начиная с этапа экстракции ДНК.

5.1.3.3. Если для контрольных образцов К1 и К2 по какому-либо из детектируемых каналов значение Ct отсутствует или для К2 определено больше граничного значения, указанного во вкладыше, расчет не производится. ПО выдает предупреждающее

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

сообщение (рис. 23), а в таблице «Результаты» в соответствующей калибратору ячейке в столбце «Статус» появляется сообщение «Сбой!».

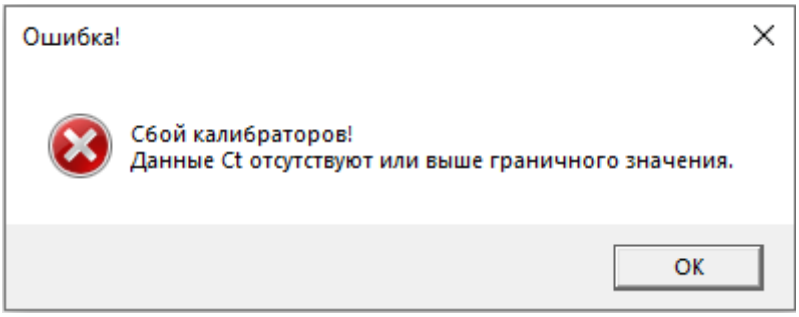


Рисунок 23

Действия оператора: Требуется повторное исследование всех образцов, начиная с этапа ПЦР.

5.1.3.4. Если для контрольных образцов К1 и К2 значение эффективности (Е) не укладывается в заданные границы, расчет не производится, ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 24), в таблице «Результаты» в столбце «Статус» появляется сообщение «Сбой!», а во вкладке «Данные калибровки» в соответствующем канале детекции появляется комментарий «Низкая эффективность», «Высокая эффективность» или «Сбой!» и все данные в столбце выделяются красным (рис.25).

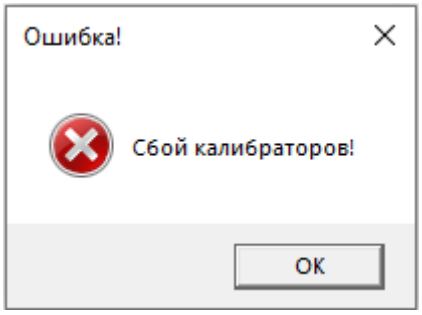


Рисунок 24

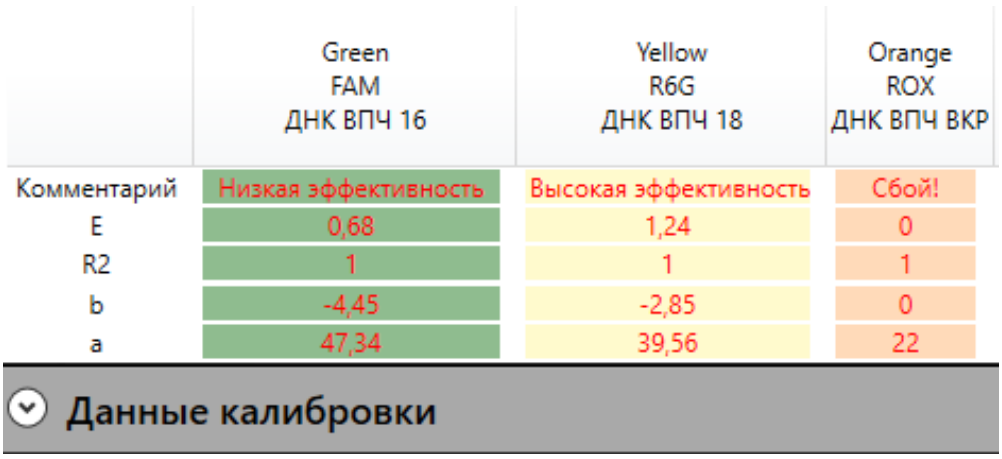


Рисунок 25

Действия оператора: Требуется повторное исследование всех образцов, начиная с этапа ПЦР.

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

5.1.4. Присутствие нескольких одинаковых контрольных образцов

Если при проведении расчета присутствует несколько обязательных контрольных образцов ОК, ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 26), расчет не производится.

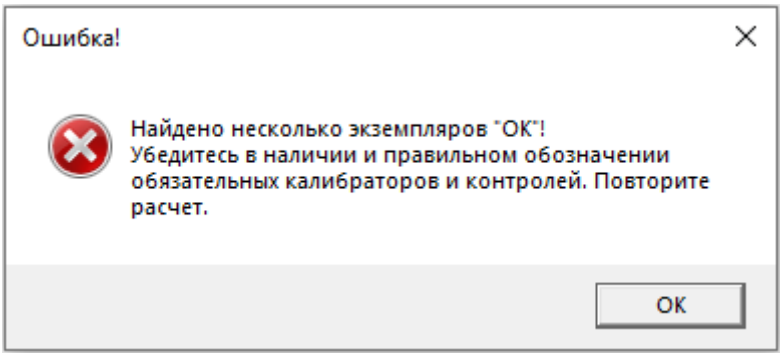


Рисунок 26

Если при проведении расчета присутствует несколько обязательных контрольных образцов К1, ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 27), расчет не производится.

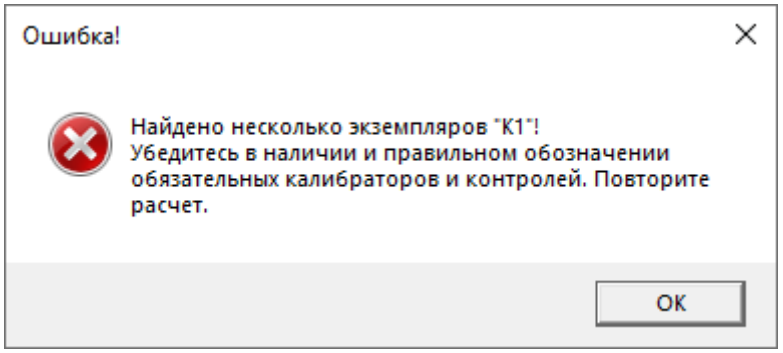


Рисунок 27

Если при проведении расчета присутствует несколько обязательных контрольных образцов К2, ПО выдает предупреждающее сообщение (рис. 28), расчет не производится.

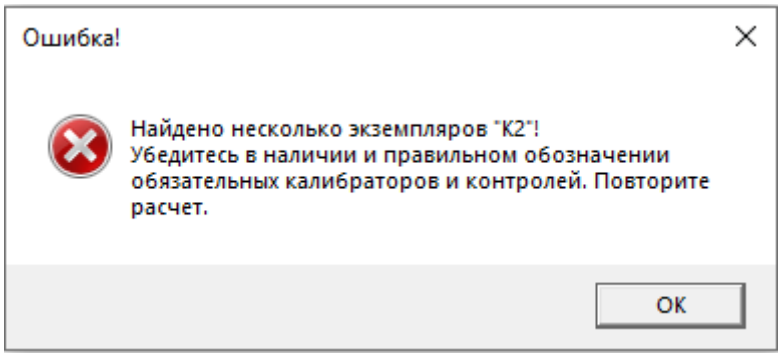


Рисунок 28

Действия оператора: Следует проверить правильность обозначения контрольных образцов и исключить их повторы.

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

5.2. Статус исследуемых образцов

5.2.1. Результаты анализа исследуемых образцов

5.2.1.1. В случае отсутствия ДНК выявляемых микроорганизмов в исследуемом образце ячейки для отображения концентрации в таблице «Результаты» (вкладка «Показать/скрыть концентрации») остаются пустыми, а в столбце «Статус» выводится сообщение: «Не обнаружено».

5.2.1.2. В случае наличия ДНК выявляемых микроорганизмов в исследуемом образце в таблице «Результаты» (вкладка «Показать/скрыть концентрации») выводится суммарная концентрация ВПЧ, указанная в lg копий/10^5 клеток человека, в соответствующих ячейках для отображения концентрации, а в столбцах «Генотип» и «Статус» выводятся сообщения: «Обнаружено ДНК:…» и «Суммарная концентрация ВПЧ<3 lg, низкий риск развития дисплазии» или «Суммарная концентрация ВПЧ≥3 lg, высокий риск развития дисплазии» соответственно.

5.2.2. Невалидные результаты для исследуемых образцов

В случае если для исследуемого образца значение Ct по каналу для флуорофора Cy5 (ДНК человека) отсутствует или определено выше граничного, или определено, но при этом рассчитанное количество клеток человека в исследуемом образце менее 500 в реакцию, его статус выдается как «Невалидный! Недостаточное количество материала для анализа».

Действия оператора: Необходимо повторное исследование образца, начиная с этапа экстракции ДНК. В случае воспроизводимого результата рекомендуется повторно провести взятие и исследование биологического материала.

6. ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Если у вас возникли какие-либо вопросы или трудности с использованием программного обеспечения «АмплиПрайм® ВПЧ ВКР 14 ПО», пожалуйста, свяжитесь с нами по контактам, указанным на официальном сайте Производителя: http://www.nextbio.ru

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

Пронумеровано, скреплено и прошито
18 лист (а/ов)

Генеральный директор Общества с
ограниченной ответственностью
«НекстБио»
_____ О.О. Лавинюков



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