ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18»

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» предназначена для определения генетического материала вируса папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) в лабораторной клинической практике.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» является высокочувствительным набором для выявления нуклеиновых кислот (НК). Лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов (ГЭ) возбудителя в реакции ПЦР-РВ. Расчетный предел обнаружения тест-системы (ГЭ/мл) в зависимости от объема образца, взятого на выделение, и от объема элюции представлен в Приложении А инструкции.

Тест-система способна выявлять выделенные НК патогена независимо от исходного типа биологического (клинического) материала.

Чувствительность тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» составляет 100% (в соответствии с панелью стандартных образцов предприятия). Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» выявляет все известные штаммы возбудителя.

Специфичность тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» составляет 100% (в соответствии с панелью стандартных образцов предприятия). Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» проанализирована на специфичность ко всем организмам доменов *Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya (Eukaryota)*, надцарства *Viruses*, в том числе (но не исключая других) наиболее часто встречаемым: *Homo sapiens, Gardnerella vaginalis, Lactobacillus spp., Escherichia coli, Streptococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Candida albicans, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealiticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma genitalium, Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas vaginalis, Treponema pallidum, Toxoplasma gondii*, HSV 1, HSV 2, CMV, EBV, HHV-6, HPV 6, HPV 11, HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 39, HPV 44, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 58, HPV 59, HPV 66, HPV 68.

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест ВПЧ 16,18» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», который позволяет за 70 – 90 минут получить достоверные результаты исследования с минимальными рисками ошибки оператора, что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Для решения разнообразных задач, стоящих перед пользователем, тест-системы исполняются в различных комплектациях: для качественного определения с экзогенным ВКО (комплектации 1, 11), для качественного определения с эндогенным ВКО (комплектации 2, 12), для определения без стадии экстракции ДНК (комплектации 3, 13), для высокочувствительного определения (комплектации 4, 14), дополнительно укомплектованные расходным материалом для ПЦР (комплектации 11, 12, 13, 14). Все реагенты тест-систем расфасованы в пробирки 1,5–2 мл, пригодные для центрифугирования. Тест-системы содержат полный комплект готовых к использованию реагентов для проведения ПЦР-исследований. Комплектации тест-систем рассчитаны на проведение 100 реакций (таблица 1).

Таблица 1. Комплектации «АртТест ВПЧ 16,18»

Комплектация	Состав
Комплектация 1	– ПЦР-реагент – 1,0 мл; – Праймеры ВПЧ – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл; – ВКО – 1,0 мл.
Комплектация 2	– ПЦР-реагент – 1,0 мл; – Праймеры ВПЧ – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл.
Комплектация 3	– ПЦР-реагент – 1,0 мл; – Праймеры ВПЧ – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл.

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

Комплектация 4	– ПЦР-реагент – 1,0 мл; – Праймеры ВПЧ – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл.
Комплектация 11	– ПЦР-реагент – 1,0 мл; – Праймеры ВПЧ – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл; – ВКО – 1,0 мл; – Расходный материал для ПЦР – 1 комплект.
Комплектация 12	– ПЦР-реагент – 1,0 мл; – Праймеры ВПЧ – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл; – Расходный материал для ПЦР – 1 комплект.
Комплектация 13	– ПЦР-реагент – 1,0 мл; – Праймеры ВПЧ – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл; – Расходный материал для ПЦР – 1 комплект.
Комплектация 14	– ПЦР-реагент – 1,0 мл; – Праймеры ВПЧ – 1,0 мл; – ПКО – 0,5 мл; – ОКО – 1,0 мл; – Расходный материал для ПЦР – 1 комплект.

Для этапа экстракции НК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртДНК Клиник», «АртНК Магнит», «АртДНК Магнит», «АртДНК легкий», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации внутреннего контроля регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации НК возбудителей регистрируется на каналах HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики и методические указания производителя.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени». Тест-система совместима со всеми амплификаторами открытого типа в том числе: Rotor-Gene Q/6000/3000 (QIAGEN GmbH), «ДТ-96», «ДТпрайм», «ДТлайт» (ООО «НПО ДНК-Технология»), Bio-Rad CFX Opus 96, CFX96, iQ5, iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.), Line-Gene 9600, 9660, QuantGene 9600 (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd), Gentier 96E, Gentier 96R (Xi`an Tianlong Science and Technology Co., Ltd), QuantStudio™ 3, QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific), 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems™), Mx 3005P™ QPCR System (Agilent).

– ПЦР-бокс;
– центрифуга/вортекс;
– набор дозаторов переменного объема;
– одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
– одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
– оптически прозрачные пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
– штативы для пробирок и наконечников;
– холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой от -24°С до -16°С;
– отдельный халат и одноразовые перчатки;
– емкость для сброса наконечников;
– комплект средств для обработки рабочего места.

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

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Анализ проводится в соответствии с Методическими указаниями к каждой комплектации, утвержденными в установленном порядке, согласно перечню:

Приложение Б - Методические указания по применению тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» Комплектация 1;

Приложение В - Методические указания по применению тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» Комплектация 2;

Приложение Г - Методические указания по применению тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» Комплектация 3;

Приложение Д - Методические указания по применению тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» Комплектация 4;

Приложение Е - Методические указания по применению тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» Комплектация 11;

Приложение Ж - Методические указания по применению тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» Комплектация 12;

Приложение З - Методические указания по применению тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» Комплектация 13;

Приложение И - Методические указания по применению тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» Комплектация 14.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

При получении разукомплектовывается в соответствии с указанными температурными режимами хранения. ПЦР часть тест-системы хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С, допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток). Расходный материал для ПЦР хранится при комнатной температуре.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» – 12 месяцев с даты изготовления.

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

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	**Возможная причина проблемы**	**Варианты решения проблемы**
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Некорректный забор биологического материала	повторить забор
	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторить анализ
		использовать новый образец материала
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в К- по каналам FAM/Green и/или HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы
Наличие сигнала в ОКЭ по каналам HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange		

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Тест-система предназначена для профессионального применения и должна использоваться только прошедшим обучение персоналом.

Информация, указанная в инструкции к тест-системе, распространяется на все комплектации, если иное не отмечено в индивидуальном порядке. Детальная информация по процедуре проведения ПЦР в зависимости от комплектации изделия и типа используемого оборудования изложена в Методических указаниях по применению каждой комплектации тест-системы.

Заявленные производителем характеристики тест-системы гарантируются только при использовании пробирок, предназначенных для постановки ПЦР в реальном времени, рекомендованных или адаптированных производителем для данной модели амплификатора.

Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации и обязуется заменить изделие, если выявленное несоответствие технических и функциональных характеристик явилось следствием скрытого дефекта используемых материалов или некачественного изготовления изделия производителем. По всем возникающим вопросам следует обращаться по телефонам и электронной почте, указанным на упаковке тест-системы.

Безопасность и качество тест-системы гарантируются в течение всего срока годности.

Тест-система не содержит инфекционных агентов, ЛВЖ, летучих и токсичных веществ, а также веществ с канцерогенным, мутагенным и тератогенным действием.

Не применять тест-систему после окончания срока годности.

Допускается продление сроков годности тест-системы по запросу пользователя в соответствии со стандартной процедурой, установленной фирмой-производителем.

При использовании тест-системы образуются отходы классов А1 и Г, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с Постановлением Министерства Здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г. № 14.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Расчетный предел обнаружения тест-системы (ГЭ/мл) в зависимости от объема образца, взятого на выделение, и от объема элюции

Объем образца, мкл	Объем элюции, мкл	Расчетная чувствительность, ГЭ/мл	Расчетная чувствительность для комплектаций 4 и 14, ГЭ/мл
100	200	1 000	333
100	100	500	166
100	50	250	83
100	25	125	–
200	200	500	166
200	100	250	83
200	50	125	41
200	25	63	–
500	200	200	66
500	100	100	33
500	50	50	16
500	25	25	–
1 000	200	100	33
1 000	100	50	16
1 000	50	25	8
1 000	25	13	–

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

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18»
Комплектация 1

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» предназначена для качественного определения ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) в лабораторной клинической практике. В состав комплектации 1 входит экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО) для контроля эффективности этапа выделения ДНК.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ[1]

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» является высокочувствительным набором для выявления ДНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР-РВ.

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест ВПЧ 16,18» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций (таблица 1).

Таблица 1. Состав «АртТест ВПЧ 16,18»

Компонент	Объем, не менее
1. ПЦР-реагент	1,0 мл
2. Праймеры ВПЧ	1,0 мл
3. ПКО	0,5 мл
4. ОКО	1,0 мл
5. ВКО	1,0 мл

Для этапа экстракции ДНК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртДНК Клиник», «АртНК Магнит», «АртДНК Магнит», «АртДНК легкий», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации экзогенного ВКО регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации ДНК возбудителя регистрируется на каналах: HEX/VIC/Yellow для ВПЧ 16 типа, ROX/Orange для ВПЧ 18 типа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики и методические указания производителя.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
– ПЦР-бокс;
– центрифуга/вортекс;
– набор дозаторов переменного объема;
– одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
– одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
– оптически прозрачные пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
– штативы для пробирок и наконечников;
– холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой от -24°С до -16°С;
– отдельный халат и одноразовые перчатки;
– емкость для сброса наконечников;
– комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение ДНК из клинического материала производится совместно с ВКО (10 мкл на выделение) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя реагентов для очистки НК.

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течение 2-4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного

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

центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов должны входить 3 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить «Мастер Микс»:

10*(N+1) мкл ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров

Где **N** – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

II. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл выделенной ДНК исследуемых образцов.

III. Внести контрольные образцы:

1) К-: 10 мкл ОКО;
2) К+: 10 мкл ПКО;
3) ОКЭ: 10 мкл ОКЭ;

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации*

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	

** Допускается добавление шага 55 °С, 10 мин в начале протокола амплификации для совместных постановок с наборами, требующими этап ревертирования.*

III. Запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончанию, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

** Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для обоих каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.*

Анализ результатов

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра выбросов («*NTC threshold/Порог Фона*») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %**;

– установить значение параметра пороговой линии («*Threshold/Порог*») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2**;

– при необходимости допускается активация функций «*Dynamic tube/Динамич.фон*» и «*Slope Correct/Коррек. Уклона*».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus»*:

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

– установить значение параметра пороговой линии («*Single Threshold*») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25 –250**;

– при необходимости допускается активация функций «*Apply Fluorescence Drift Correction*» и «*Baseline Subtracted Curve fit*».

в) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «*Пороговый (Ct)*»;

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5»*:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%**;

д) для остальных амплификаторов открытого типа:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

** В зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.*

*** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.*

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу	
		HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	FAM/Green
ОКЭ	Экстракция ДНК	–	+
К-	ПЦР	–	–
К+	ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии экстракции ДНК.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Интерпретация результатов образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу		
	HEX/VIC/Yellow	ROX/Orange	FAM/Green
Положительный ВПЧ 16 типа	+	+/–	+/–
Положительный ВПЧ 18 типа	+/–	+	+/–
Отрицательный	–	–	+
Невалидный	–	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию

«+/–» значение «Ct» для данного канала не анализируется

Рекомендуемый алгоритм анализа образцов:

а) проанализировать образцы по каналу возбудителя (HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange), для положительных выдать заключение;

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК.

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

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

Тест-система хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С. Допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток).

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» – 12 месяцев с даты изготовления.

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	**Возможная причина проблемы**	**Варианты решения проблемы**
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторить анализ
		использовать новый образец материала
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в К-по каналам FAM/Green и/или HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы
Наличие сигнала в ОКЭ по каналам HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange		

[1] Более полное описание характеристик тест-системы представлено в инструкции по применению

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

ПРИЛОЖЕНИЕ В

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18»
Комплектация 2

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» предназначена для качественного определения ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) в лабораторной клинической практике. Комплектация 2 содержит эндогенный внутренний контроль для контроля этапа забора образца и выделения ДНК.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ[1]

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» является высокочувствительным набором для выявления ДНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР-РВ.

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест ВПЧ 16,18» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций (таблица 1).

Таблица 1. Состав «АртТест ВПЧ 16,18»

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

Для этапа экстракции ДНК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртДНК Клиник», «АртНК Магнит», «АртДНК Магнит», «АртДНК легкий», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации эндогенного внутреннего контроля регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации ДНК возбудителя регистрируется на каналах: HEX/VIC/Yellow для ВПЧ 16 типа, ROX/Orange для ВПЧ 18 типа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики и методические указания производителя.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
– ПЦР-бокс;
– центрифуга/вортекс;
– набор дозаторов переменного объема;
– одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
– одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
– оптически прозрачные пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
– штативы для пробирок и наконечников;
– холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой от -24°С до -16°С;
– отдельный халат и одноразовые перчатки;
– емкость для сброса наконечников;
– комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение ДНК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией фирмы изготовителя реагентов для очистки ДНК.

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного

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

центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов должны входить 3 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить «Мастер Микс»:

10*(N+1) мкл ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров

Где **N** – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

II. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл выделенной ДНК исследуемых образцов.

III. Внести контрольные образцы:

1) К-: 10 мкл ОКО;
2) К+: 10 мкл ПКО;
3) ОКЭ: 10 мкл ОКЭ.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации*

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	

** Допускается добавление шага 55 °С, 10 мин в начале протокола амплификации для совместных постановок с наборами, требующими этап ревертирования.*

III. Запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончанию, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

** Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для обоих каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.*

Анализ результатов

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра выбросов (*«NTC threshold/Порог Фона»*) – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %**;

– установить значение параметра пороговой линии (*«Threshold/Порог»*) – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2**;

– при необходимости допускается активация функций *«Dynamic tube/Динамич.фон»* и *«Slope*

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

Correct/Коррек. Уклона».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus»*:

– установить значение параметра пороговой линии («*Single Threshold*») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25 –250**;

– при необходимости допускается активация функций «*Apply Fluorescence Drift Correction*» и «*Baseline Subtracted Curve fit*».

в) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «*Пороговый (Ct)*»;

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5»*:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%**;

д) для остальных амплификаторов открытого типа:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

** В зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.*

*** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.*

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	**Контролируемый этап анализа**	**Значение «Ct» по каналу**	
		HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	**FAM/Green**
ОКЭ	Экстракция ДНК	–	+/–
К-	ПЦР	–	–
К+	ПЦР	**+**	**+**

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии экстракции ДНК.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Интерпретация результатов образцов

Результат образца	**Значение «Ct» по каналу**		
	HEX/VIC/Yellow	**ROX/Orange**	**FAM/Green**
Положительный ВПЧ 16 типа	**+**	+/–	+/–
Положительный ВПЧ 18 типа	+/–	**+**	+/–
Отрицательный	–	–	**+**
Невалидный	–	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию

«+/–» значение «Ct» для данного канала не анализируется

Рекомендуемый алгоритм анализа образцов:

а) проанализировать образцы по каналу возбудителя (HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange), для положительных выдать заключение;

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

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

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

Тест-система хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С. Допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток).

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» – 12 месяцев с даты изготовления.

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	**Возможная причина проблемы**	**Варианты решения проблемы**
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Некорректный забор биологического материала	повторить забор
	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторить анализ
		использовать новый образец материала
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в ОКЭ по каналам HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы

[1] Более полное описание характеристик тест-системы представлено в инструкции по применению

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

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18»
Комплектация 3

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» предназначена для качественного определения ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) без стадии экстракции ДНК в лабораторной клинической практике.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ[1]

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» является высокочувствительным набором для выявления ДНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР-РВ.

Тест-система содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест ВПЧ 16,18» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Комплектация рассчитана на проведение 100 реакций (таблица 1).

Таблица 1. Состав тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18»

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

Для этапа забора образцов рекомендуется использование реагентов: «Транспортная среда», «Транспортная среда с муколитиком» (производства ООО «АртБиоТех», РБ).

Результат амплификации эндогенного внутреннего контроля регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации ДНК возбудителя регистрируется на каналах: HEX/VIC/Yellow для ВПЧ 16 типа, ROX/Orange для ВПЧ 18 типа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики и методические указания производителя.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
– ПЦР-бокс;
– центрифуга/вортекс;
– набор дозаторов переменного объема;
– одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
– одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
– оптически прозрачные пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
– штативы для пробирок и наконечников;
– холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой от -24°С до -16°С;
– отдельный халат и одноразовые перчатки;
– емкость для сброса наконечников;
– комплект средств для обработки рабочего места.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Отбор образцов мазков, соскобов и отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта осуществляется в соответствии с существующими ТНПА, методическими указаниями и инструкциями.

Перед отбором мазков не допускается проведение гигиенических процедур, а также обработка медицинскими препаратами.

Не рекомендуется использовать «Зонд «Юнона»: урогенитальный», рекомендованы к использованию «Зонд «Юнона»: урогенитальный флокированный», «Зонд «Юнона»: цитощетка».

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

Не допускается замораживание образцов. Перед постановкой ПЦР образцы перемешать на вортексе, кратковременным центрифугированием осадить капли со стенок пробирок.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов должны входить 2 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить «Мастер Микс»:

10*(N+1) мкл ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров

Где **N** – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

II. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл исследуемых образцов.

III. Внести контрольные образцы:

1) К-: 10 мкл ОКО;
2) К+: 10 мкл ПКО.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации*

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	

** Допускается добавление шага 55 °С, 10 мин в начале протокола амплификации для совместных постановок с наборами, требующими этап ревертирования.*

III. Запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончанию, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

** Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для обоих каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.*

Анализ результатов

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра выбросов («*NTC threshold/Порог Фона*») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %**;

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

– установить значение параметра пороговой линии («*Threshold/Порог*») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2**;

– при необходимости допускается активация функций «*Dynamic tube/Динамич.фон*» и «*Slope Correct/Коррек. Уклона*».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus»*:

– установить значение параметра пороговой линии («*Single Threshold*») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25 –250**;

– при необходимости допускается активация функций «*Apply Fluorescence Drift Correction*» и «*Baseline Subtracted Curve fit*».

в) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «*Пороговый (Ct)*»;

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5»*:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%**;

д) для остальных амплификаторов открытого типа:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

** В зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.*

*** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.*

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу	
		HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	FAM/Green
K-	ПЦР	–	+/–
K+	ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольных точек K- и K+ необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки ПЦР.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Интерпретация результатов образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу		
	HEX/VIC/Yellow	ROX/Orange	FAM/Green
Положительный ВПЧ 16 типа	**+**	+/–	+/–
Положительный ВПЧ 18 типа	+/–	**+**	+/–
Отрицательный	–	–	**+**
Невалидный	–	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию

«+/–» –значение «Ct» для данного канала не анализируется

Рекомендуемый алгоритм анализа образцов:

а) проанализировать образцы по каналу возбудителя (HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange), для положительных выдать заключение;

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать

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

заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная со стадии постановки ПЦР или со стадии забора материала.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

Тест-система хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24°С до -16°С. Допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток).

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» – 12 месяцев с даты изготовления.

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	**Возможная причина проблемы**	**Варианты решения проблемы**
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Некорректный забор биологического материала	повторить забор
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать другие зонды для отбора материала
		использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторите анализ
		использовать новый образец материала
		провести этап выделения ДНК для образца
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в К- по каналам HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры использовать новые наборы

[1] Более полное описание характеристики тест-системы представлено в инструкции по применению

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

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18»
Комплектация 4

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» предназначена для качественного определения ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) в лабораторной клинической практике. Комплектация 4 является высокочувствительной и позволяет дополнительно анализировать РНК возбудителя, а также использовать больший объем выделенных нуклеиновых кислот (далее НК).

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ[1]

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» является высокочувствительным набором для выявления ДНК/РНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР-РВ.

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест ВПЧ 16,18» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций (таблица 1).

Таблица 1. Состав «АртТест ВПЧ 16,18»

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

Для этапа экстракции НК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртДНК Клиник», «АртНК Магнит», «АртДНК Магнит», «АртДНК легкий», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации эндогенного внутреннего контроля регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации НК возбудителя регистрируется на каналах: HEX/VIC/Yellow для ВПЧ 16 типа, ROX/Orange для ВПЧ 18 типа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики и методические указания производителя.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
– ПЦР-бокс;
– центрифуга/вортекс;
– набор дозаторов переменного объема;
– одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
– одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
– оптически прозрачные пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
– штативы для пробирок и наконечников;
– холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой от -24°С до -16°С;
– отдельный халат и одноразовые перчатки;
– емкость для сброса наконечников;
– комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение НК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией фирмы изготовителя реагентов для очистки НК.

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз

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

(или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов должны входить 3 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить «Мастер Микс»:

10*(N+1) мкл ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров

Где **N** – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

II. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 30 мкл выделенных НК исследуемых образцов.

III. Внести контрольные образцы:

1) К-: 30 мкл ОКО;
2) К+: 30 мкл ПКО;
3) ОКЭ: 30 мкл ОКЭ.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	

III. Запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончанию, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

** Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для обоих каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.*

Анализ результатов

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра выбросов («*NTC threshold/Порог Фона*») – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %**;

– установить значение параметра пороговой линии («*Threshold/Порог*») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2**;

– при необходимости допускается активация функций «*Dynamic tube/Динамич.фон*» и «*Slope*

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

Correct/Коррек. Уклона».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus»*:

– установить значение параметра пороговой линии («*Single Threshold*») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25 –250**;

– при необходимости допускается активация функций «*Apply Fluorescence Drift Correction*» и «*Baseline Subtracted Curve fit*».

в) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «*Пороговый (Ct)*»;

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5»*:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%**;

д) для остальных амплификаторов открытого типа:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

** В зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.*

*** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.*

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу	
		HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	FAM/Green
ОКЭ	Экстракция НК	–	+/–
К-	ПЦР	–	–
К+	ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии экстракции ДНК.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Интерпретация результатов образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу		
	HEX/VIC/Yellow	ROX/Orange	FAM/Green
Положительный ВПЧ 16 типа	**+**	+/–	+/–
Положительный ВПЧ 18 типа	+/–	**+**	+/–
Отрицательный	–	–	**+**
Невалидный	–	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию

«+/–» значение «Ct» для данного канала не анализируется

Рекомендуемый алгоритм анализа образцов:

а) проанализировать образцы по каналу возбудителя (HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange), для положительных выдать заключение;

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

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

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

Тест-система хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С. Допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток).

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» – 12 месяцев с даты изготовления.

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	**Возможная причина проблемы**	**Варианты решения проблемы**
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Некорректный забор биологического материала	повторить забор
	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторите анализ
		использовать новый образец материала
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в ОКЭ по каналам HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы

[1] Более полное описание характеристики тест-системы представлено в инструкции по применению

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

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18»
Комплектация 11

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» предназначена для качественного определения ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) в лабораторной клинической практике. В состав комплектации 11 входит экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО) для контроля эффективности этапа выделения ДНК, а также расходный материал для ПЦР.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ[1]

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» является высокочувствительным набором для выявления ДНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР-РВ.

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест ВПЧ 16,18» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций (таблица 1).

Таблица 1. Состав «АртТест ВПЧ 16,18»

Комплект для ПЦР (часть 1 из 2)	
Компонент	Объем, не менее
1. ПЦР-реагент	1,0 мл
2. Праймеры ВПЧ	1,0 мл
3. ПКО	0,5 мл
4. ОКО	1,0 мл
5. ВКО	1,0 мл
Комплект пластика (часть 2 из 2)	
Расходный материал для ПЦР	1 комплект

Для этапа экстракции ДНК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртДНК Клиник», «АртНК Магнит», «АртДНК Магнит», «АртДНК легкий», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации экзогенного ВКО регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации ДНК возбудителя регистрируется на каналах: HEX/VIC/Yellow для ВПЧ 16 типа, ROX/Orange для ВПЧ 18 типа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики и методические указания производителя.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
– ПЦР-бокс;
– центрифуга/вортекс;
– набор дозаторов переменного объема;
– одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
– одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
– оптически прозрачные пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
– штативы для пробирок и наконечников;
– холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой от -24°С до -16°С;
– отдельный халат и одноразовые перчатки;
– емкость для сброса наконечников;
– комплект средств для обработки рабочего места.

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

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение ДНК из клинического материала производится совместно с ВКО (10 мкл на выделение) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя реагентов для очистки НК.

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течение 2-4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов должны входить 3 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить «Мастер Микс»:

10*(N+1) мкл ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров

Где **N** – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

II. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл выделенной ДНК исследуемых образцов.

III. Внести контрольные образцы:

1) К-: 10 мкл ОКО;
2) К+: 10 мкл ПКО;
3) ОКЭ: 10 мкл ОКЭ.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации*

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	

** Допускается добавление шага 55 °С, 10 мин в начале протокола амплификации для совместных постановок с наборами, требующими этап ревертирования.*

III. Запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончанию, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

** Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для обоих каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.*

Анализ результатов

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра выбросов («*NTC threshold/Порог Фона*») – 10%. При необходимости порог

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

фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %**;

– установить значение параметра пороговой линии («*Threshold/Порог*») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2**;

– при необходимости допускается активация функций «*Dynamic tube/Динамич.фон*» и «*Slope Correct/Коррек. Уклона*».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus»*:

– установить значение параметра пороговой линии («*Single Threshold*») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25 –250**;

– при необходимости допускается активация функций «*Apply Fluorescence Drift Correction*» и «*Baseline Subtracted Curve fit*».

в) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «*Пороговый (Ct)*»;

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5»*:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%**;

д) для остальных амплификаторов открытого типа:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

** В зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.*

*** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.*

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	**Контролируемый этап анализа**	**Значение «Ct» по каналу**	
		HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	**FAM/Green**
ОКЭ	Экстракция ДНК	–	**+**
К-	ПЦР	–	**–**
К+	ПЦР	**+**	**+**

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии экстракции ДНК.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Интерпретация результатов образцов

Результат образца	**Значение «Ct» по каналу**		
	HEX/VIC/Yellow	**ROX/Orange**	**FAM/Green**
Положительный ВПЧ 16 типа	**+**	+/–	+/–
Положительный ВПЧ 18 типа	+/–	**+**	+/–
Отрицательный	–	–	**+**
Невалидный	–	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию

«+/–» значение «Ct» для данного канала не анализируется

Рекомендуемый алгоритм анализа образцов:

а) проанализировать образцы по каналу возбудителя (HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange), для положительных выдать заключение;

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

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

При получении разукомплектовывается в соответствии с указанными температурными режимами хранения. ПЦР часть тест-системы хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С, допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток). Расходный материал для ПЦР хранится при комнатной температуре.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» – 12 месяцев с даты изготовления.

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	**Возможная причина проблемы**	**Варианты решения проблемы**
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторить анализ
		использовать новый образец материала
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в К-по каналам FAM/Green и/или HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы
Наличие сигнала в ОКЭ по каналу HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange		

[1] Более полное описание характеристик тест-системы представлено в инструкции по применению

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

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18»
Комплектация 12

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» предназначена для качественного определения ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) в лабораторной клинической практике. Комплектация 12 содержит эндогенный внутренний контроль для контроля этапа забора образца и выделения ДНК, а также расходный материал для ПЦР.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ[1]

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» является высокочувствительным набором для выявления ДНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР-РВ.

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест ВПЧ 16,18» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций (таблица 1).

Таблица 1. Состав «АртТест ВПЧ 16,18»

Комплект для ПЦР (часть 1 из 2)	
Компонент	Объем, не менее
1. ПЦР-реагент	1,0 мл
2. Праймеры ВПЧ	1,0 мл
3. ПКО	0,5 мл
4. ОКО	1,0 мл
Комплект пластика (часть 2 из 2)	
Расходный материал для ПЦР	1 комплект

Для этапа экстракции ДНК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртДНК Клиник», «АртНК Магнит», «АртДНК Магнит», «АртДНК легкий», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации эндогенного внутреннего контроля регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации ДНК возбудителя регистрируется на каналах: HEX/VIC/Yellow для ВПЧ 16 типа, ROX/Orange для ВПЧ 18 типа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики и методические указания производителя.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
– ПЦР-бокс;
– центрифуга/вортекс;
– набор дозаторов переменного объема;
– одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
– одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
– оптически прозрачные пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
– штативы для пробирок и наконечников;
– холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой от -24°С до -16°С;
– отдельный халат и одноразовые перчатки;
– емкость для сброса наконечников;
– комплект средств для обработки рабочего места.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение ДНК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией фирмы изготовителя реагентов для очистки ДНК.

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

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов должны входить 3 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить «Мастер Микс»:

10*(N+1) мкл ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров

Где **N** – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

II. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл выделенной ДНК исследуемых образцов.

III. Внести контрольные образцы:

1) К-: 10 мкл ОКО;
2) К+: 10 мкл ПКО;
3) ОКЭ: 10 мкл ОКЭ.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации*

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	

** Допускается добавление шага 55 °С, 10 мин в начале протокола амплификации для совместных постановок с наборами, требующими этап ревертирования.*

III. Запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончанию, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

** Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для обоих каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.*

Анализ результатов

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра выбросов (*«NTC threshold/Порог Фона»*) – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %**;

– установить значение параметра пороговой линии (*«Threshold/Порог»*) – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2**;

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

– при необходимости допускается активация функций «*Dynamic tube/Динамич.фон*» и «*Slope Correct/Коррек. Уклона*».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus»*:

– установить значение параметра пороговой линии («*Single Threshold*») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25 –250**;

– при необходимости допускается активация функций «*Apply Fluorescence Drift Correction*» и «*Baseline Subtracted Curve fit*».

в) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «*Пороговый (Ct)*»;

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5»*:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%**;

д) для остальных амплификаторов открытого типа:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

** В зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.*

*** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.*

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	**Контролируемый этап анализа**	**Значение «Ct» по каналу**	
		HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	**FAM/Green**
ОКЭ	Экстракция ДНК	–	+/–
К-	ПЦР	–	–
К+	ПЦР	**+**	**+**

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии экстракции ДНК.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Интерпретация результатов образцов

Результат образца	**Значение «Ct» по каналу**		
	HEX/VIC/Yellow	**ROX/Orange**	**FAM/Green**
Положительный ВПЧ 16 типа	**+**	+/–	+/–
Положительный ВПЧ 18 типа	+/–	**+**	+/–
Отрицательный	–	–	**+**
Невалидный	–	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию

«+/–» значение «Ct» для данного канала не анализируется

Рекомендуемый алгоритм анализа образцов:

а) проанализировать образцы по каналу возбудителя (HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange), для положительных выдать заключение;

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

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

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

При получении разукомплектовывается в соответствии с указанными температурными режимами хранения. ПЦР часть тест-системы хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С, допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток). Расходный материал для ПЦР хранится при комнатной температуре.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» – 12 месяцев с даты изготовления.

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	**Возможная причина проблемы**	**Варианты решения проблемы**
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Некорректный забор биологического материала	повторить забор
	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторить анализ
		использовать новый образец материала
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в ОКЭ по каналам HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы

[1] Более полное описание характеристик тест-системы представлено в инструкции по применению

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18»
Комплектация 13

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» предназначена для качественного определения ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) без стадии экстракции ДНК в лабораторной клинической практике. В состав комплектации 13 входит расходный материал для ПЦР.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ[1]

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» является высокочувствительным набором для выявления ДНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР-РВ.

Тест-система содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест ВПЧ 16,18» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Комплектация рассчитана на проведение 100 реакций (таблица 1).

Таблица 1. Состав «АртТест ВПЧ 16,18»

Комплект для ПЦР (часть 1 из 2)	
Компонент	Объем, не менее
1. ПЦР-реагент	1,0 мл
2. Праймеры ВПЧ	1,0 мл
3. ПКО	0,5 мл
4. ОКО	1,0 мл
Комплект пластика (часть 2 из 2)	
Расходный материал для ПЦР	1 комплект

Для этапа забора образцов рекомендуется использование реагентов: «Транспортная среда», «Транспортная среда с муколитиком» (производства ООО «АртБиоТех», РБ).

Результат амплификации эндогенного внутреннего контроля регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации ДНК возбудителя регистрируется на каналах: HEX/VIC/Yellow для ВПЧ 16 типа, ROX/Orange для ВПЧ 18 типа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики и методические указания производителя.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
– ПЦР-бокс;
– центрифуга/вортекс;
– набор дозаторов переменного объема;
– одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
– одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
– оптически прозрачные пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
– штативы для пробирок и наконечников;
– холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой от -24°С до -16°С;
– отдельный халат и одноразовые перчатки;
– емкость для сброса наконечников;
– комплект средств для обработки рабочего места.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Отбор образцов мазков, соскобов и отделяемого слизистых оболочек урогенитального тракта осуществляется в соответствии с существующими ТНПА, методическими рекомендациями и инструкциями.

Перед отбором мазков не допускается проведение гигиенических процедур, а также обработка

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

медицинскими препаратами.

Не рекомендуется использовать «Зонд «Юнона»: урогенитальный», рекомендованы к использованию «Зонд «Юнона»: урогенитальный флокированный», «Зонд «Юнона»: цитощетка».

Не допускается замораживание образцов. Перед постановкой ПЦР образцы перемешать на вортексе, кратковременным центрифугированием осадить капли со стенок пробирок.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов должны входить 2 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить «Мастер Микс»:

10*(N+1) мкл ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров

Где **N** – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

II. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 10 мкл исследуемых образцов.

III. Внести контрольные образцы:

1) К-: 10 мкл ОКО;
2) К+: 10 мкл ПКО.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации*

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	

** Допускается добавление шага 55 °С, 10 мин в начале протокола амплификации для совместных постановок с наборами, требующими этап ревертирования.*

III. Запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончанию, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

** Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для обоих каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.*

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

Анализ результатов

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра выбросов (*«NTC threshold/Порог Фона»*) – 10%. При необходимости порог фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %**;

– установить значение параметра пороговой линии (*«Threshold/Порог»*) – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2**;

– при необходимости допускается активация функций *«Dynamic tube/Динамич.фон»* и *«Slope Correct/Коррек. Уклона»*.

б) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus»*:

– установить значение параметра пороговой линии (*«Single Threshold»*) – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25 –250**;

– при необходимости допускается активация функций *«Apply Fluorescence Drift Correction»* и *«Baseline Subtracted Curve fit»*.

в) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «*Пороговый (Ct)*»;

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5»*:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%**;

д) для остальных амплификаторов открытого типа:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

** В зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.*

*** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.*

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу	
		HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	FAM/Green
K-	ПЦР	**–**	+/–
K+	ПЦР	**+**	**+**

В случае несоответствия контрольных точек K- и K+ необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии постановки ПЦР.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Интерпретация результатов образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу		
	HEX/VIC/Yellow	ROX/Orange	FAM/Green
Положительный ВПЧ 16 типа	**+**	+/–	+/–
Положительный ВПЧ 18 типа	+/–	**+**	+/–
Отрицательный	–	–	**+**
Невалидный	–	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию

«+/–» –значение «Ct» для данного канала не анализируется

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

Рекомендуемый алгоритм анализа образцов:

а) проанализировать образцы по каналу возбудителя (HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange), для положительных выдать заключение;

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная со стадии постановки ПЦР или со стадии забора материала.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

При получении разукомплектовывается в соответствии с указанными температурными режимами хранения. ПЦР часть тест-системы хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С, допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток). Расходный материал для ПЦР хранится при комнатной температуре.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» – 12 месяцев с даты изготовления.

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	**Возможная причина проблемы**	**Варианты решения проблемы**
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Некорректный забор биологического материала	повторить забор
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать другие зонды для отбора материала
		использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторите анализ
		использовать новый образец материала
		провести этап выделения ДНК для образца
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в К- по каналам HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры использовать новые наборы

[1] Более полное описание характеристики тест-системы представлено в инструкции по применению

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

ПРИЛОЖЕНИЕ И

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18»
Комплектация 14

НАЗНАЧЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» предназначена для качественного определения ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) 16 и 18 типов методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) в лабораторной клинической практике. Комплектация 14 является высокочувствительной и позволяет дополнительно анализировать РНК возбудителя, а также использовать больший объем выделенных нуклеиновых кислот (далее НК). В состав данной комплектации входит расходный материал для ПЦР.

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ[1]

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» является высокочувствительным набором для выявления ДНК/РНК: лимит детекции составляет 5 геном-эквивалентов возбудителя в реакции ПЦР-РВ.

Тест-система «АртТест ВПЧ 16,18» содержит в своем составе фермент урацил-ДНК-гликозилазу (УДГ) и дУТФ, что позволяет избежать контаминации ПЦР-смеси продуктами предшествующих ПЦР и получения ложноположительных результатов.

В тест-системе «АртТест ВПЧ 16,18» используется быстрый и простой протокол амплификации, идентичный протоколам тест-систем серии «АртТест», что существенно повышает поточность лабораторных анализов.

Комплектация тест-системы рассчитана на проведение 100 реакций (таблица 1).

Таблица 1. Состав «АртТест ВПЧ 16,18»

Комплект для ПЦР (часть 1 из 2)	
Компонент	Объем, не менее
1. ПЦР-реагент	1,0 мл
2. Праймеры ВПЧ	1,0 мл
3. ПКО	0,5 мл
4. ОКО	1,0 мл
Комплект для ПЦР (часть 2 из 2)	
Расходный материал для ПЦР	1 комплект

Для этапа экстракции НК из образца рекомендуется использование реагентов: «АртДНК Клиник», «АртНК Магнит», «АртДНК Магнит», «АртДНК легкий», «АртРНК экстракт».

Результат амплификации эндогенного внутреннего контроля регистрируется на канале FAM/Green, результат амплификации НК возбудителя регистрируется на каналах: HEX/VIC/Yellow для ВПЧ 16 типа, ROX/Orange для ВПЧ 18 типа.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с тест-системой необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной клинической ПЦР-диагностики и методические указания производителя.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с детекцией результатов в режиме «реального времени»;
– ПЦР-бокс;
– центрифуга/вортекс;
– набор дозаторов переменного объема;
– одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
– одноразовые полипропиленовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
– оптически прозрачные пробирки для ПЦР-РВ, адаптированные для используемого амплификатора;
– штативы для пробирок и наконечников;
– холодильник от +2°С до +8°С с морозильной камерой от -24°С до -16°С;
– отдельный халат и одноразовые перчатки;
– емкость для сброса наконечников;
– комплект средств для обработки рабочего места.

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

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выделение НК из клинического материала производится в соответствии с инструкцией фирмы изготовителя реагентов для очистки НК.

Подготовка ПЦР-смеси

0. Разморозить все реагенты (при необходимости), перемешать перевернув пробирки несколько раз (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд) и сбросить капли с помощью кратковременного центрифугирования.

I. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов должны входить 3 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (К-), положительный контроль ПЦР (К+), отрицательный контроль экстракции (ОКЭ).

В пробирке объемом 1,5 – 2 мл приготовить «Мастер Микс»:

10*(N+1) мкл ПЦР-реагента + 10*(N+1) мкл праймеров

Где **N** – общее количество реакций амплификации с учетом контрольных образцов.

Перемешать «Мастер Микс» путем 5-ти кратного переворачивания пробирки (или перемешиванием на вортексе в течении 2–4 секунд), осадить кратковременным центрифугированием и внести по 20 мкл в пробирки для проведения ПЦР.

II. Используя наконечник с фильтром в подготовленные пробирки добавить по 30 мкл выделенных НК исследуемых образцов.

III. Внести контрольные образцы:

1) К-: 30 мкл ОКО;
2) К+: 30 мкл ПКО;
3) ОКЭ: 30 мкл ОКЭ.

Герметично закрыть пробирки крышками. В случае наличия пузырьков в растворе или капель на стенках пробирок – удалить кратковременным центрифугированием. Рекомендуется перемешать содержимое путем 2-кратного переворачивания ПЦР-пробирок с последующим осаждением кратковременным центрифугированием.

Постановка реакции амплификации

I. Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в амплификатор.

II. В соответствии с инструкцией к прибору запрограммировать амплификатор согласно таблице 2.

Таблица 2. Параметры амплификации

Шаг	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
Обратная транскрипция	55	10 мин	1
Начальная денатурация	95	15 мин	1
Денатурация	95	5 сек	5
Отжиг	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	
Денатурация	95	5 сек	40
Отжиг/Детекция по каналам: FAM/Green, HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	63	10 сек	
Элонгация	67	10 сек	

III. Запрограммировать положение пробирок в амплификаторе. Допускается выполнять данный шаг во время проведения амплификации или по ее окончанию, если это позволяет программное обеспечение прибора.

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

** Для приборов «Rotor-Gene» перед запуском выбрать функцию: «Perform Calibration Before 1st Acquisition/Perform Optimization Before 1st Acquisition/Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции». Для обоих каналов установить параметры «Min Reading/Миним. Сигнал» – 5Fl и «Max Reading/Максим. Сигнал» – 10Fl.*

Анализ результатов

I. Перед началом анализа необходимо задать настройки в соответствии с инструкцией к прибору.

а) для приборов типа «Rotor-Gene 3000/6000/Q»*:

– установить значение параметра выбросов (*«NTC threshold/Порог Фона»*) – 10%. При необходимости порог

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

фона может быть изменен в диапазоне 0 – 30 %**;

– установить значение параметра пороговой линии («*Threshold/Порог*») – 0,02. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 0,02 – 0,2**;

– при необходимости допускается активация функций «*Dynamic tube/Динамич.фон*» и «*Slope Correct/Коррек. Уклона*».

б) для приборов «Bio-Rad CFX96/Opus»*:

– установить значение параметра пороговой линии («*Single Threshold*») – 50. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 25 –250**;

– при необходимости допускается активация функций «*Apply Fluorescence Drift Correction*» и «*Baseline Subtracted Curve fit*».

в) для приборов «ДТ-96/ДТпрайм/ДТлайт»*:

– установить «Метод» – «*Пороговый (Ct)*»;

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

г) для приборов типа «QuantStudio 3/5»*:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%**;

д) для остальных амплификаторов открытого типа:

– установить значение параметра пороговой линии 10 %, полученного для образца ПКО в последнем цикле амплификации. При необходимости порог может быть изменен в диапазоне 5 – 30%.**

** В зависимости от установленной версии программного обеспечения названия команд могут несколько отличаться.*

*** Необходимость корректировки выбросов возникает в случаях сильных колебаний флуоресценции в отдельных пробах.*

II. Выбрать логарифмическую шкалу для отражения результатов и визуально проконтролировать пересечение пороговой линии в линейной части роста кривой амплификации. При пересечении пороговой линии с кривой амплификации не в линейном участке – переместить ее вручную до необходимого уровня.

Результаты анализа интерпретируются на основании наличия/отсутствия пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией (что соответствует наличию/отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

III. Удостовериться, что ПЦР-исследование валидно: контрольные точки анализа должны соответствовать значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа контрольных точек

Контрольная точка	Контролируемый этап анализа	Значение «Ct» по каналу	
		HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	FAM/Green
ОКЭ	Экстракция НК	–	+/–
К-	ПЦР	–	–
К+	ПЦР	+	+

В случае несоответствия контрольных точек требуемым значениям необходимо провести повторное исследование всех образцов начиная со стадии экстракции ДНК.

IV. Интерпретировать результаты ПЦР-анализа исследуемых образцов в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4. Интерпретация результатов образцов

Результат образца	Значение «Ct» по каналу		
	HEX/VIC/Yellow	ROX/Orange	FAM/Green
Положительный ВПЧ 16 типа	+	+/–	+/–
Положительный ВПЧ 18 типа	+/–	+	+/–
Отрицательный	–	–	+
Невалидный	–	–	–

«–» обозначает отсутствие значения «Ct», график амплификации не пересекает пороговую линию

«+» обозначает наличие значения «Ct», график амплификации пересекает пороговую линию

«+/–» значение «Ct» для данного канала не анализируется

Рекомендуемый алгоритм анализа образцов:

а) проанализировать образцы по каналу возбудителя (HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange), для положительных выдать заключение;

б) проанализировать оставшиеся образцы по каналу ВКО (FAM/Green), для валидных выдать

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

заключение;

в) оставшиеся образцы являются невалидными.

В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции НК.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ

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

При получении разукомплектовывается в соответствии с указанными температурными режимами хранения. ПЦР часть тест-системы хранится в упаковке изготовителя при температуре от -24 °С до -16 °С, допускается хранение тест-системы при температуре +2 – +8 °С (до 30 суток). Расходный материал для ПЦР хранится при комнатной температуре.

Допускается заморозка/оттаивание компонентов тест-системы до 10 раз.

Срок годности тест-системы «АртТест ВПЧ 16,18» – 12 месяцев с даты изготовления.

ЧАСТО ВСТРЕЧАЕМЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ РАБОТЕ И МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблема	**Возможная причина проблемы**	**Варианты решения проблемы**
Нет сигнала по каналу FAM/Green	Некорректный забор биологического материала	повторить забор
	Некорректное выделение НК из образцов	повторить выделение НК
	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
		не подвергать воздействию УФ-облучения одноразовый пластиковый расходный материал (пробирки, наконечники)
	ПЦР ингибирование	развести образец в 5 раз в элюирующем буфере, повторите анализ
		использовать новый образец материала
		использовать сорбентный метод выделения НК
Нет сигнала в К+	Использование неподходящих расходных материалов	использовать пробирки для постановки ПЦР, рекомендованные фирмой-производителем амплификатора либо адаптированные для используемого прибора
	Некорректное приготовление ПЦР-смеси	приготовить новую ПЦР-смесь
	Некорректные параметры амплификации	установить параметры амплификации в соответствии с таблицей 2
	Некорректные условия хранения наборов	использовать наборы, которые хранились в надлежащих условиях
Наличие сигнала в ОКЭ по каналам HEX/VIC/Yellow, ROX/Orange	Контаминация	провести деконтаминационные процедуры; использовать новые наборы

[1] Более полное описание характеристики тест-системы представлено в инструкции по применению

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